

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 3 月 29 日 (29.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/21787 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P 21/02, C07K 14/47, 7/08, 16/18, A61K 48/00, 38/10, 38/17, A61P 25/28, 25/00
- (74) 代理人: 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/06314
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) 国際出願日: 2000 年 9 月 14 日 (14.09.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願平11/264679 1999 年 9 月 17 日 (17.09.1999) JP
特願2000/201456 2000 年 6 月 29 日 (29.06.2000) JP
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人慶應義塾 (KEIO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒108-8345 東京都港区三田二丁目15番45号 Tokyo (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 西本征央 (NISHIMOTO, Ikuo) [JP/JP]; 〒160-8582 東京都新宿区信濃町35 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP).
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: POLYPEPTIDE HUMANIN INHIBITING NERVE CELL DEATH

WO 01/21787 A1

(54) 発明の名称: 神経細胞死を抑制するポリペプチド、Humanin

(57) Abstract: A polypeptide which inhibits nerve cell death in association with Alzheimer's disease. By using a nerve cell system capable of inducing the expression of familial Alzheimer's disease variant APP by treating with ecdysone, a gene having an activity of protecting the nerve cells from cell death is successfully isolated. This gene encodes a secretory polypeptide consisting of 24 amino acids. This polypeptide shows an activity of inhibiting nerve cell death caused by the expression of an APP variant and a presenilin variant. This polypeptide also inhibits cell death caused by A β in primary nerve culture. By modifying the amino acids of this polypeptide, moreover, the cell death inhibitory activity can be significantly elevated. These polypeptides and derivatives thereof are useful as medicines for preventing nerve cell death in association with Alzheimer's disease and as seed compounds for developing novel medicines for Alzheimer's disease.

[続葉有]



(57) 要約:

本発明は、アルツハイマー病に関連する神経細胞死を抑制するポリペプチドを提供する。エクダイソン処理により家族性アルツハイマー病変異APPの発現を誘導できる神経細胞系を用いて、該神経細胞を細胞死から保護する活性を有する遺伝子を単離することに成功した。該遺伝子は、24アミノ酸からなる分泌性のポリペプチドをコードしており、このポリペプチドは、APP変異体およびプレセニリン変異体の発現による神経細胞死を抑制する活性を示した。このポリペプチドはまた、初代神経培養のA β による細胞死をも抑制した。また、ポリペプチドのアミノ酸に変異を加えることにより、神経細胞死抑制活性を有意に上昇させることにも成功した。これらのポリペプチドおよびその誘導体は、アルツハイマー病に関連する神経細胞死を予防する医薬として、また新たなアルツハイマー病薬開発のためのリード化合物として有用である。

明細書

神経細胞死を抑制するポリペプチド、Humanin

技術分野

本発明は、アルツハイマー病に関連する細胞死から神経細胞を保護するポリペプチドに関する。

背景技術

アルツハイマー病(Alzheimer's disease; AD)は現在最も精力的に研究されている神経変性疾患であり、臨床的には進行性の記憶喪失および認知障害、病理学的には広範囲の神経喪失、神経細胞内集積物 (intraneuronal tangles)、およびコンゴーレッドに高親和性の核 (congophilic dence core) を持つ細胞外老人斑により特徴付けられる。ADに対する効果的な治療方法は未だ存在しない。進行性の神経細胞死により、この疾患の臨床発現の全てではないにしても、その多くを説明できることが一般に受け入れられており、ADにおける神経細胞死発症の病理機構を解明し、これを防ぐことは、これまでにない有効なAD治療法を確立するために必須である。

早発性の家族性AD (FAD) を引き起こす既知の変異遺伝子としては、4種の異なるグループ: V642I/F/G APP (数字は 695アミノ酸を持つAPPである APP₆₉₅ のもの)、K595N/M596L APP (NL-APP)、プレセニリン(PS)-1変異体、およびPS-2変異体が存在する (Shastry, B.S. and Giblin, F.J. (1999) Brain Res. Bull. 48, 121-127)。Yamatsujiらは、APPの3つのV642型変異 cDNA を神経細胞株 F11 に一過的に発現させた時の観察に基づき、これらのFAD遺伝子群が、神経細胞の細胞死を引き起こし得ること示唆した (Yamatsuji, T. et al. (1996) Science 272, 1349-1352)。この観察は、初代培養神経や他の神経細胞株を用いた実験によっても確認され

た (Zhao, B. et al. (1997) J. Neurosci. Res. 47, 253-263; Luo, J. J. et al. (1999) J. Neurosci. Res. 55, 629-42)。また、Wolozinらは、FAD関連変異 N141I PS-2 が PC12 細胞において有意に細胞死の比率を高めること、そしてFAD関連変異 PS-1 がTリンパ球のアポトーシスを誘導することを見出した (Wolozin, B. et al. (1996) Science 274, 1710-1713; Wolozin, B. et al. (1998) Neurobiol. Aging 19, S23-27)。さらに、PS-1についても、 $A\beta$ 添加や栄養因子(trophic factor)の欠乏により誘導される神経細胞死の感受性が、PS-1変異体の発現により上昇すること (Guo, Q. et al. (1996) Neuroreport 8, 379-83; Zhang, Z. et al. (1998) Nature 395, 698-702; Guo, Q. et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 4125-30)、また、野生型PS-1を過剰発現するトランスジェニックラットに由来する培養皮質神経は、非トランスジェニックのコントロールに比べ、栄養因子欠乏による細胞死に対する感受性が高まる (Czech, C. et al. (1998) Neuroscience 87, 325-36) ことなどが繰り返し観察されている。変異PS-1 が神経細胞死の刺激因子であるのか、または神経細胞死に対し効果を持たないのかについては議論の余地が残されているものの (Weihl, C. C. et al. (1999) J. Neurosci. 19, 5360-9; Bursztajn, S. et al. (1998) J. Neurosci. 18, 9790-9)、既知の4種のFAD遺伝子 (V642型変異APP、NL-APP、PS-1変異体、およびPS-2変異体)の全てが、神経細胞死を誘導するか、または特定の条件下で他の細胞死刺激に対する神経細胞の傷害性を増強させている可能性が高い。ゆえに、AD治療法の開発に最も重要な鍵は、神経細胞で観察されるAD遺伝子により誘導される細胞死を抑制できる分子を探し出すことであると考えられる。

発明の開示

本発明は、アルツハイマー病に関連する細胞死から神経細胞を保護するポリペプチドおよびその利用を提供することを課題とする。

本発明者はこれまでに、家族性アルツハイマー病型変異 V642I アミロイド前駆

体蛋白質 (V642I APP) を誘導的に発現する神経細胞系 (F11/EcR/V642I) を確立している (国際公開番号 W000/14204参照)。この系では、V642I APPが F11神経細胞においてエクダイソン処理に応答して発現する。F11/EcR/V642I 細胞をエクダイソンと2～3日インキュベートすることにより、ほぼ全ての細胞が細胞死を起こすが、対照のインキュベーションではごく少数の細胞が細胞死を起こすに過ぎない。本発明者は、このF11/EcR/V642I 細胞を、V642I APPにより誘導される神経細胞に対するアンタゴニストとして作用する遺伝子の検索に利用した。

すなわち、アルツハイマー病 (AD) 患者脳より発現cDNAライブラリーを構築し、これを上記 F11/EcR/V642I 細胞にトランスフェクションして、V642I APP による神経細胞死から生き残った細胞を選択するデストラップ法によるスクリーニング操作を繰り返し行った。その結果、本発明者は、V642I APP による神経細胞死を保護する新規な遺伝子を同定することに成功した。Humanin (HN) cDNAと名づけられたこのクローンは、新規な24アミノ酸のポリペプチドをコードしており、ADに関連する神経細胞死、すなわち、既知の全てのタイプの早発型家族性AD遺伝子 [V642I APP、K595N/M596L APP、M146L プレセニリン(PS)-1、および N141I PS-2] およびA β 1-43により誘導される神経細胞死を抑制することが判明した。これに対し、ハンチントン病 (HD) / 脊髄小脳性運動失調症 (spinocerebellar ataxia; SCA) に関連したポリグルタミンリピート Q79 や、筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) に関連した Cu/Zn依存性スーパーオキシドディスムターゼ (Cu/Zn-dependent superoxide dismutase; SOD1) 変異体による神経毒性に対しては効果を示さなかった。HN mRNA は中枢神経系以外の幾つかの器官で主に産生されていた。HN cDNAを神経細胞にトランスフェクションしたところ、転写され予想されるペプチドが産生された後、培養液中に分泌され約10 μ Mのレベルに達した。この培養上清には、V642I APPによる神経細胞死からの有意な保護を示すのに十分な活性が含まれていた。合成 HN ポリペプチドもまた、同様の用量-応答特性で4種のAD遺伝子に対する神経保護作用を示し、1～10 μ Mでその抑制は最

大となった。分泌能を欠損させたHN誘導体をコードするcDNAを神経細胞で発現させたところ、細胞内で発現されたポリペプチドは細胞死を保護することができなかったが、同じポリペプチドを合成して培養液に添加した場合は保護作用を示したことから、HNポリペプチドは細胞の外側から作用することが判明した。ポリペプチドの構造を変えて活性を試験した結果、8番目のCysと14番目のSerが重要であることが判明した。C8Aの置換は細胞死からのレスキュー活性を完全に欠損させ、S14Gの置換はレスキュー活性を顕著に増加させた。S14G HN ポリペプチド (HNG) は、低nM (1~10nM) で、4種すべてのFAD遺伝子からの完全な保護作用を示した。HNの抗AD活性は初代培養皮質神経においても観察され、HNにおいては μ Mレベルで、またS14G誘導体 (HNG) においてはnMレベルで、 $A\beta$ が引き起こす細胞死および細胞傷害を保護したが、C8A (HNA) にはその活性は見られなかった。さらに、詳細な構造／機能関係を解析した結果、3番目のProから19番目のProまでが神経保護機能にとって重要であり、その中でも活性に本質的な7残基を特定するに至った。また、S14G HN ポリペプチド (HNG) のC8のアミノ酸は、抗AD活性を保ったまま、His、Arg、またはLysといった塩基性アミノ酸に置換可能であった。さらに、S14G HN ポリペプチドに2アミノ酸の変異を導入した結果、神経保護作用をさらに高めることに成功した。これらの知見を基に、より活性が高く生体投与に適したポリペプチドを開発することが可能である。これらのポリペプチドは、ADの治療薬開発に新たな道を開くと共に、神経細胞死からの保護を目的とするAD治療方法の開発に大きく貢献すると考えられる。

本発明は、ADに関連する神経細胞死から細胞を保護する新規なポリペプチドおよびその利用に関し、より具体的には、

(1) 式 (I)

$\text{Pro-Xn}_1\text{-(Cys/bXaa)-(Leu/Arg)-Xn}_2\text{-Leu-Thr-(Gly/Ser)-Xn}_3\text{-Pro}$ (I)

(式中、「Cys/bXaa」はCysまたは塩基性アミノ酸、「(Leu/Arg)」はLeuまたはArg、「(Gly/Ser)」はGlyまたはSerであり、 Xn_1 、 Xn_2 、および Xn_3 はそれぞれ独立に10

残基以下の任意のアミノ酸を表す)

からなるアミノ酸配列を含み、アルツハイマー病に関連する神経細胞死を抑制する活性を有するポリペプチド、

(2) 下記 (a) または (b) に記載のポリペプチド、

(a) 配列番号：5～8、10、12、13、21～24、26～29、32、33、37～40、46、48、54、および60からなる群より選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(b) 配列番号：5～8、10、12、13、21～24、26～29、32、33、37～40、46、48、54、および60からなる群より選択されるアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を含み、アルツハイマー病に関連する神経細胞死を抑制する活性を有するポリペプチド、

(3) 神経細胞死の抑制のために用いる、(1) または (2) に記載のポリペプチド、

(4) (1) から (3) のいずれかに記載のポリペプチドと他のポリペプチドとの融合ポリペプチド、

(5) (1) から (4) のいずれかに記載のポリペプチドをコードするDNA、

(6) (5) に記載のDNAが挿入されたベクター、

(7) (6) に記載のベクターを保持する宿主細胞、

(8) (7) に記載の宿主細胞を培養し、発現させたポリペプチドを該宿主細胞またはその培養上清から回収する工程を含む、(1) から (4) のいずれかに記載のポリペプチドの製造方法、

(9) (1) から (4) のいずれかに記載のポリペプチドを神経細胞に接触させる工程を含む、神経細胞死を抑制する方法、

(10) (1) から (4) のいずれかに記載のポリペプチドによる細胞死の抑制活性を検出する方法であって、

(a) (1) から (4) のいずれかに記載のポリペプチドの存在下で細胞死を誘導する工程、

(b) 細胞死を検出する工程、を含む方法、

(11) (1) から (4) のいずれかに記載のポリペプチドによる神経細胞死の抑制に対する化合物の効果を検出する方法であって、

(a) 被検化合物および (1) から (4) のいずれかに記載のポリペプチドの存在下で神経細胞死を誘導する工程、

(b) 神経細胞死を検出する工程、を含む方法、

(12) (1) から (4) のいずれかに記載のポリペプチドによる神経細胞死の抑制を調節する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検試料および (1) から (4) のいずれかに記載のポリペプチドの存在下で神経細胞死を誘導する工程、

(b) 神経細胞死を検出する工程、

(c) 神経細胞死を促進または抑制する化合物を選択する工程、を含む方法、

(13) (1) から (4) のいずれかに記載のポリペプチドまたは (6) に記載のペクターを有効成分とする医薬組成物、

(14) 神経細胞死抑制剤である、(13) に記載の医薬組成物、

(15) 神経変性を伴う疾病の予防または治療に用いられる、(13) に記載の医薬組成物、

(16) アルツハイマー病の予防または治療に用いられる、(13) に記載の医薬組成物、

(17) (1) から (3) のいずれかに記載のポリペプチドに結合する抗体、

(18) 配列番号：4 に記載の塩基配列からなる DNA またはその相補鎖に相補的な少なくとも 15 ヌクレオチドを含む、(1) から (4) のいずれかに記載のポリペプチドをコードする DNA の検出または操作に用いられる DNA、

(19) (1) から (4) のいずれかに記載のポリペプチドに結合する化合物のス

クリーニング方法であって、

- (a) 該ポリペプチドに被検試料を接触させる工程、
- (b) 該ポリペプチドと被検試料との結合活性を検出する工程、
- (c) 該ポリペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法、に関する。

本発明においてポリペプチドとは2またはそれ以上のアミノ酸またはアミノ酸誘導体が結合したペプチドまたは蛋白質を指す。ポリペプチドにはペプチドイソステア (peptide isosteres) が含まれてもよい。ポリペプチドは、通常、ペプチド、オリゴペプチド、またはオリゴマーなどと呼ばれるような短い鎖も含まれる。また、蛋白質と呼ばれるような、長い鎖のものも含む。ポリペプチドは、翻訳後修飾などにより天然に修飾されていてもよい。また人工的に修飾されていてもよい。修飾には、ペプチドのバックボーン、アミノ酸側鎖、アミノ末端、またはカルボキシル末端などの修飾が含まれる。また、ポリペプチドは分岐していてもよく、環状でもよい。修飾には、アセチル化、アシル化、ADPリボシル化、アミド化、[フラビン (flavin)、ヌクレオチド、ヌクレオチド誘導体、脂質、脂質誘導体、またはホスファチジルイノシトール]等の共有結合、クロスリンク形成、環状化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、ヒログルタミン酸化、 γ -カルボキシル化、グリコシル化、ヒドロキシル化、ヨード化、メチル化、ミリストイル化、酸化、リン酸化、ユビキチン化などが含まれるが、これらに制限されない。

本発明は、アルツハイマー病に関連する細胞死から神経細胞を保護するポリペプチドを提供する。本発明者が単離した、Humanin (HN) ポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号：5に、該ポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームのcDNA配列を配列番号：4に示す。Humanin は、ADに関連する神経細胞死をアンタゴナイズする活性を有しており、約10 μ Mの濃度で飽和活性を示す。また、Humanin のアミノ酸置換体である HNG (S14G) (配列番号：8) は、Humanin に比べ 100~1000倍高いアンタゴナイズ効果を示した。また、HNGの8番目のCysは、His

、Arg、またはLysといった塩基性アミノ酸に置換可能であり、これによりポリペプチド中のSH基の修飾による活性への影響を回避することが可能となる。さらに、HNGの誘導体であるAGA-HNG（配列番号：60）はHNGよりも数倍高い活性を示した。本発明のポリペプチドには、Humanin、HNG、AGA-HNG、およびそれらのCys残基（C8という）を塩基性アミノ酸に置換した置換体が含まれる。

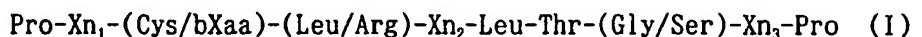
また、本発明により、HumaninのC末にFLAGタグ（DYKDDDDK）を付加しても、神経保護作用に影響を与えないことが示された（実施例3）。さらに、HumaninのC末4アミノ酸（KRRA）を他のアミノ酸に置換しても、元々のHumaninと同等の神経保護作用を有していた（実施例6）。これらの事実は、Humanin、HNG、AGA-HNG、またはそれらのC8の塩基性アミノ酸への置換体のアミノ酸配列に変異を導入することによって、これらと同等またはそれ以上の神経保護作用を有するポリペプチドを作製できることを証明している。

本発明者はHumaninの欠失変異体を用いたさらに詳細な解析を行い、Humaninの3番目～19番目からなる17アミノ酸のポリペプチド（HN-17、配列番号：21）でも、神経に対する防御活性を示すのに十分であることを見出した（実施例13）。さらに、HNGの3番目のProから19番目のProからなるポリペプチド（HNG-17、配列番号：24）の各アミノ酸残基を他のアミノ酸に置換して、その神経細胞死抑制活性を検証したところ、活性を維持したまま半数以上のアミノ酸残基が置換可能であった。この実験により、HNG-17中で神経細胞死の抑制に本質的なアミノ酸は、1番目のPro、6位のCys、7番目のLeu、10～12番目のLeu-Thr-Gly、17番目のProの7アミノ酸であることが判明した。従って、これらの残基を維持したまま、他の残基を置換、欠失、および／または挿入等により改変することによりさらにアミノ酸配列を持つ異なるポリペプチドを作製することも可能である。

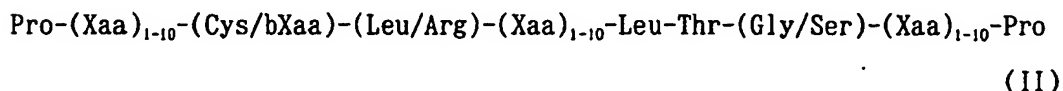
重要なのは、活性に本質的な上記の7アミノ酸でさえも、他のアミノ酸に置換可能であることである。例えば、HNG-17の12番目のGlyはSerであっても（すなわちHN-17）、神経防御活性は失われない。また、7番目のLeuに相当する部位がArgに置

換されている合成ポリペプチド (HNR; 配列番号: 7) は、合成HNと同等の神経防御活性を示した (実施例 12)。また上記のようにNHG-17の6番目に相当するCysは、HNGにおいてHis、Arg、またはLysといった塩基性アミノ酸に置換しても神経防御活性を示し、特に、このCysをArgまたはLysへ置換したHNG変異体はもともとHNGと同等の神経防御活性を示した (実施例 14)。これらの事実から、本実施例で活性の検出されたポリペプチドのアミノ酸において、活性に非本質的および/または本質的なアミノ酸の変異により、これらのポリペプチドと同等またはそれ以上の神経細胞死抑制活性を有するポリペプチドを作製することも可能であると考えられる。

本発明のポリペプチドは、式 (I)



からなるアミノ酸配列を含み、アルツハイマー病 (AD) に関連する神経細胞死を抑制する活性を有するポリペプチドが含まれる。式中、「Cys/bXaa」はCysまたは塩基性アミノ酸、「(Leu/Arg)」はLeuまたはArg、「(Gly/Ser)」はGlyまたはSerであり、Xn₁、Xn₂、およびXn₃はそれぞれ独立に10残基以下の任意のアミノ酸を表す。このようなアミノ酸配列を有するポリペプチドは、



(式中、Xaaは任意のアミノ酸、「(Xaa)_{m-n}」はm~n残基の任意のアミノ酸、「bXaa」は塩基性アミノ酸、「Cys/bXaa」はCysまたは塩基性アミノ酸、「(Leu/Arg)」はLeuまたはArg、「(Gly/Ser)」はGlyまたはSerを表す)

とも表現される。

塩基性アミノ酸とは、R基 (側鎖) がpH7.0で陽電荷を持つアミノ酸を言う。天然の塩基性アミノ酸としては、Arg、Lys、またはHisが挙げられる。塩基性アミノ酸として Arg、Lys、またはHis を持つ本発明のポリペプチドのアミノ酸配列は、例えば

Pro-X_{n1}-(Cys/Arg/Lys/His)-(Leu/Arg)-X_{n2}-Leu-Thr-(Gly/Ser)-X_{n3}-Pro (III)

(式中、「(Cys/Arg/Lys/His)」はCys、Arg、Lys、または His、「(Leu/Arg)」はLeu またはArg、「(Gly/Ser)」はGlyまたはSerであり、X_{n1}、X_{n2}、およびX_{n3}はそれぞれ 独立に10残基以下の任意のアミノ酸を表す)

と表現することもできる。本発明において、この位置の塩基性アミノ酸としては 特にArgまたはLysが好ましい。

好ましくは、X_{n1}、X_{n2}、およびX_{n3}はそれぞれ独立に 2~6、0~4、および 2~6 残 基の任意のアミノ酸 (すなわち、X_{n1}=(Xaa)₂₋₆、X_{n2}=(Xaa)₀₋₄、および X_{n3}=(Xaa)₂₋₆)、より好ましくはそれぞれ独立に 3~5、1~3、および 3~5 残基の任意のアミ ノ酸 (すなわち、X_{n1}=(Xaa)₃₋₅、X_{n2}=(Xaa)₁₋₃、および X_{n3}=(Xaa)₃₋₅)、最も好まし くはそれぞれ独立に 4、2、および 4残基の任意のアミノ酸 (すなわち、X_{n1}=(Xaa)₄、 X_{n2}=(Xaa)₂、および X_{n3}=(Xaa)₄) である。6残基程度の付加されたアミノ酸はα ヘリックスを形成しアミノ酸1残基のように振舞うことがある。本発明のポリペ プチドとしては、4残基、2残基、および 4残基の任意のアミノ酸からなる X_{n1}、 X_{n2}、およびX_{n3}のいずれかまたは全てに、6残基またはそれ以下の任意のアミノ酸 が付加されたポリペプチドであってもよい。

このようなポリペプチドは、公知のペプチド合成技術により製造することが可 能であり、また、これらポリペプチドをコードするDNAを発現させることによって も製造することが可能である。

X_{n1} の配列としては、好ましくは、例えば (Arg/Ala)-(Gly/Ala)-(Phe/Ala)- (Ser/Ala)からなる配列およびこれらの配列に保存的置換が加えられた配列が含 まれる。ここで、例えば「Arg/Ala」はArgまたはAlaであることを示す (他も同様 に「/」はいずれかの残基であることを表す)。このような配列としては、Arg- Gly-Phe-Ser、Ala-Gly-Phe-Ser、Arg-Ala-Phe-Ser、Arg-Gly-Ala-Ser、または Arg-Gly-Phe-Alaなどが挙げられる。他にも、Arg-Gly-Ala-Ala、Arg-Ala-Phe-Ala、 Arg-Ala-Ala-Ser、Arg-Ala-Ala-Ala、Ala-Gly-Phe-Ala、Ala-Gly-Ala-Ser、

Ala-Gly-Ala-Ala、Ala-Ala-Phe-Ser、Ala-Ala-Phe-Ala、Ala-Ala-Ala-Ser、および Ala-Ala-Ala-Alaなどが含まれる。また、保存的置換としては、後述の保存的置換に相当するアミノ酸のグループ内の置換などが挙げられる。また、 Xn_2 の配列としては、好ましくは、例えば (Leu/Ala)-(Leu/Ala)からなる配列およびこれらの配列に保存的置換が加えられた配列が含まれる。このような配列としては、Leu-Leu、Ala-Leu、Leu-Alaなどが挙げられる。また、Ala-Alaが含まれる。また、 Xn_3 の配列としては、好ましくは、例えば (Glu/Ala)-(Ile/Ala)-(Asp/Ala)-(Leu/Ala)からなる配列およびこれらの配列に保存的置換が加えられた配列が含まれる。このような配列としては、Glu-Ile-Asp-Leu、Ala-Ile-Asp-Leu、Glu-Ala-Asp-Leu、Glu-Ile-Ala-Leu、Glu-Ile-Asp-Alaなどが挙げられる。他にも、Glu-Ile-Ala-Ala、Glu-Ala-Asp-Ala、Glu-Ala-Ala-Leu、Glu-Ala-Ala-Ala、Ala-Ile-Asp-Ala、Ala-Ile-Ala-Leu、Ala-Ile-Ala-Ala、Ala-Ala-Asp-Leu、Ala-Ala-Asp-Ala、Ala-Ala-Ala-Leu、および Ala-Ala-Ala-Alaなどが含まれる。 Xn_1 、 Xn_2 、および Xn_3 の配列は任意の組み合わせで選択し得る。

ADに関連する神経細胞死は、株化神経細胞（例えば F11 細胞）や初代神経培養（例えばラット脳皮質初代培養）における APP、PS-1、または PS-2 の変異体（例えば V642I/F/G APP、NL-APP、M146L PS-1、および N141I PS-2）の発現により引き起こされる他、初代神経培養への $A\beta$ （例えば $A\beta$ 1-43）の添加によっても引き起こされる。本発明において「アルツハイマー病に関連する神経細胞死を抑制する」とは、上記を含むADに関連する神経細胞死の少なくとも1つを抑制することを指す。すなわち本発明のポリペプチドには、これらのADに関連する神経細胞死の少なくともいずれかを抑制する活性を有しているものが含まれる。細胞死の抑制は、完全な抑制ではなくても、有意に抑制されればよい。神経細胞死の抑制活性は、実施例に記載された方法または他に記載の方法（例えば国際公開番号 W000/14204参照）に従って検定することができる。

具体的な方法を例示すれば、例えば V642I/F/G APP、NL-APP、M146L PS-1、ま

たは N141I PS-2などのFAD遺伝子を発現するベクターを単独で、または検定したいポリペプチドを発現するベクターと共に神経細胞（例えばF11細胞）にトランスフェクトし、一定時間（例えば72時間）培養後、細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定する。または、検定したいポリペプチドを予め調製しておき、このポリペプチドの存在下または非存在下で細胞にFAD遺伝子をトランスフェクトして、細胞死を測定してもよい。FAD遺伝子は、誘導性プロモーターを用いてコンディショナルに発現させることもできる。検定したいポリペプチドの非存在下で誘導される細胞死に対して、ポリペプチド存在下における細胞死が有意に低下すれば、このポリペプチドはADに関連する神経細胞死を抑制する活性を有すると判定される。細胞としては、他に初代培養神経などを用いてもよいし、細胞死の誘導はA β の添加などで行ってもよい。また、細胞死の測定はトリパンブルー排除以外にも、形態変化、LDH放出、またはアポトーシス（核の形態変化またはDNA断片化など）の測定によって行うことも可能である。

本発明のポリペプチドは、また、配列番号：5～8、10、12、13、21～24、26～29、32、33、37～40、46、48、54、および60からなる群より選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、および該ポリペプチドにおいて、1または複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を含み、アルツハイマー病（AD）に関連する神経細胞死を抑制する活性を有するポリペプチドが含まれる。

変異させるアミノ酸残基数に特に制限はないが、置換、欠失、および／または挿入によりアミノ酸配列を改変する場合は、その数は通常、15残基以内のアミノ酸、より好ましくは12以内、さらに好ましくは10以内、さらに好ましくは8以内（例えば5個以内）であると考えられる。付加されるアミノ酸は、ADに関連する神経細胞死を抑制する活性が保持される限り制限はない。アミノ酸の置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列は、人為的に作出したものであってもよく、また自然に生じたポリペプチドの配列であってもよい。

アミノ酸を人為的に置換する場合、性質の似たアミノ酸に置換すれば、もとのポリペプチドの活性が維持されやすいと考えられる。本発明のポリペプチドは、配列番号：5～8、10、12、13、21～24、26～29、32、33、37～40、46、48、54、および60からなる群より選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのアミノ酸に保存的置換が加えられたポリペプチドであって、ADに関連する神経細胞死を抑制する活性を有するポリペプチドが含まれる。保存的置換は、神経細胞死抑制に本質的なアミノ酸（例えば HNG-17 において本質的な上記7アミノ酸）を置換する場合などにおいても重要であると考えられる。このようなアミノ酸の保存的置換は、当業者にはよく知られている。保存的置換に相当するアミノ酸のグループとしては、例えば、塩基性アミノ酸（例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性アミノ酸（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性アミノ酸（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性アミノ酸（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、 β 分岐アミノ酸（例えばスレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族アミノ酸（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）などが挙げられる。また、非保存的置換によりポリペプチドの神経細胞死抑制活性、安定性、組織移行性などをより上昇または下降させることも考えられる。

本発明のポリペプチドは、公知のペプチド合成技術によって合成ポリペプチドとして製造することができる（日本生化学会編，新生化学実験講座 タンパク質 VI，pp.3-74，東京化学同人，1992年）。ペプチドの合成法は、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。また、合成DNAの作製や部位特異的変異導入法などにより Humanin cDNA（例えば配列番号：4）に変異を導入し、これを宿主細胞で発現させて、任意のアミノ酸変異を有するポリペプチドを調製することも可能である。改変されるアミノ酸の数や位置は、得られるポリペプチドがADに関連す

る神経細胞死を抑制する活性を有する限り制限はない。

本発明のポリペプチドは、そのアミノ酸残基数に特に制限はないが、例えば医薬組成物として使用する場合には、一般に分子サイズが小さい方が好ましい。活性に必要な部分（例えばアミノ酸残基または官能基）を持たないことは、抗原性を低下させ、他の分子との非特異的な相互作用を回避できることから、好ましくない副作用を低減させる効果も期待できる。本発明のポリペプチドは、好ましくはアミノ酸500残基以内、より好ましくは100残基以内、より好ましくは50残基以内、さらに好ましくは30残基以内である。平均分子量としては、好ましくは60kDa以内、より好ましくは15kDa以内、より好ましくは6kDa以内、さらに好ましくは4kDa以内である。

本発明は、また、上記本発明のポリペプチドと他のポリペプチドとの融合ポリペプチドに関する。融合ポリペプチドとは、天然において隣接していない少なくとも2つのポリペプチドが連結したポリペプチドであり、ペプチド合成により、またはポリペプチドのコード領域をフレームが一致するように連結させた核酸を発現させることにより製造することができる。他のポリペプチドとしてはタグのような数残基の短いペプチドから蛋白質のような長いポリペプチドまで任意のポリペプチドが挙げられる。具体的には、Hisタグ、HAタグ、GFP、マルトース結合蛋白質、グルタチオン S-トランスフェラーゼ（GST）などが挙げられる。また、抗体断片（Fc断片）などが挙げられる。さらに、リーダー配列、分泌シグナル、プレ蛋白質またはプロ蛋白質の配列などが挙げられるが、それらに制限されない。本発明のポリペプチドを有効に脳血液関門を通過せしめるために、これを容易にする一群のポリペプチドを融合することもできる。

また、本発明のポリペプチドには、その塩も含まれる。このような塩は酸または塩基から誘導される。具体的には、例えば無機酸との塩（例えば、塩酸塩、リン酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、硝酸塩など）、有機酸との塩（例えば、酢酸塩、乳酸塩、ギ酸塩、酪酸塩、グリコール酸塩、プロピオン酸塩、フマル酸塩、マレ

イン酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、クエン酸塩、リンゴ酸塩、シュウ酸塩、安息香酸塩、メタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩など)、あるいは塩基との塩(例えば、アンモニウム塩、ナトリウム塩やカリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩およびマグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、有機塩基との塩、およびアルギニンやリジンなどのアミノ酸との塩)が挙げられる。

また、本発明のポリペプチドには、その誘導体が含まれる。ここで「誘導体」とは、本発明のポリペプチドの官能基を既知の方法により修飾、付加、変異、置換、または削除などにより改変された形態を持つ分子を意味する。このような官能基の改変は、例えば、ポリペプチドに存在する官能基の保護、ポリペプチドの安定性または組織移行性の制御、あるいはポリペプチドの活性の制御等を目的として行われうる。例えば、本発明のポリペプチドには、そのN末端、C末端、及びポリペプチドを構成するアミノ酸の側鎖の官能基のいずれかが保護基等の他の置換基によって修飾されているものが含まれる。置換基としては、例えば各種のアルキル基、アシル基、アミド体、リン酸基、アミノ基、カルボキシル基、エステル基など挙げられるがこれらに制限されない。

また、本発明のポリペプチドには、ポリペプチド同士を結合させたダイマーなどの重合体、分枝状分子、環化分子が含まれる。また、ポリペプチドは担体に結合していてもよい。例えば、本発明のポリペプチドは、ポリエチレングリコール(PEG)、デキストラン(dextran)、あるいは他のポリマーなどと結合していてもよい。

本発明のポリペプチドを構成するアミノ酸は、L体および/またはD体であることができる。D体のアミノ酸の使用は、ペプチダーゼによる分解を低下させるために有用である。また、アミノ酸は天然のアミノ酸に限定されず、非天然のアミノ酸でもよい。例えば、ホモセリン、 β -ヒドロキシバリン、0-4-ヒドロキシフェニルチロシン、 α -t-ブチルグリシン、2-アミノ酪酸、 α -シクロヘキシルグリシン、 α -フェニルグリシンなどをあげることができる。また、ポリペプチドのペプチ

ド結合は、適宜ペプチド結合以外の共有結合に置換することが考えられる。非ペプチド結合への置換により、ペプチダーゼによる感受性を下げ、薬効の持続性の向上や投与ルートを選択の幅を広げることができる。非ペプチド結合の例としては、イミノ結合、エステル結合、ヒドラジン結合、セミカルバジド結合、およびアゾ結合などが挙げられるが、これらに制限されない。

また、本発明のポリペプチドの構造を模倣する化合物を設計することも考えられる。例えば、本発明のポリペプチドの構造に関する物理的および化学的性質を、活性部位修飾手法、NMR、X線結晶解析を含む公知の手法によって解析し、これを基にポリペプチドの神経保護作用に重要な物理的および化学的機能のマップを作成する。この機能を模倣した分子を設計し合成する。また、本発明のポリペプチドは、その活性の高さから受容体に結合すると考えられるが、同受容体に結合する化合物を設計することも考えられる。このように誘導された分子が神経保護作用を有するか否かは、実施例に記載の方法に従ってアッセイすることができる。

本発明は、また、本発明のポリペプチドをコードするDNAを提供する。本発明のDNAの由来は特に制限されず、合成DNA、ゲノムDNA、cDNAなどが含まれる。本発明のDNAには、配列番号：4で示されるHumaninをコードするcDNAが含まれる。また、配列番号：5～8、10、12、13、21～24、26～29、32、33、37～40、46、48、54、または60に記載のアミノ酸をコードする任意の縮重に基づく塩基配列を有するDNAが含まれる。また、本発明のDNAは、コード領域以外に、5'および3'に非コード配列（非転写配列、非翻訳配列、プロモーター、エンハンサー、サプレッサー、転写因子結合配列、スプライシング配列、ポリA付加配列、IRES、mRNA安定化・不安定化配列等を含む）を含んでもよい。

本発明のDNAは、ベクターに挿入して本発明のポリペプチドの生産に利用することができる他、後述するように遺伝子治療目的に利用することができる。

本発明のポリペプチドの産生のために用いられる宿主に特に制限はなく、大腸

菌、酵母、哺乳動物細胞、植物細胞、昆虫細胞などの細胞または個体を用いることができる。宿主ベクター系としては、例えば、バキュロウイルス-Sf細胞系 (Okamoto et al., J. Biol. Chem. 270: 4205-4208, 1995)、pcDNA-CHO細胞系 (Takahashi et al., J. Biol. Chem. 270: 19041-19045, 1995)、および CMVプロモータープラスミド-COS細胞系 (Yamatsuji et al., EMBO J. 15: 498-509, 1996) などが挙げられるが、これらに制限されない。

本発明のポリペプチドは、宿主細胞から分泌せうる。実施例で示されるように、Humanin および HNG 等は、発現させた細胞から細胞外に分泌され、分泌されたポリペプチドは神経細胞死をアンタゴナイズする活性を示した。細胞外に分泌させた場合には、本発明のポリペプチドは宿主細胞の培養上清から簡便に回収することが可能である。

本発明のポリペプチド、または本発明のポリペプチドをコードするDNAは、神経細胞死を抑制するための試薬とすることができる。DNAは適宜ベクターに組み込み、該ベクターを試薬することができる。本発明のポリペプチド、または本発明のポリペプチドをコードするDNAを含む試薬は、ポリペプチドやDNA自体を試薬として用いる他、滅菌水、生理食塩水、緩衝剤、塩、安定剤、保存剤、界面活性剤、他の蛋白質 (BSAなど)、トランスフェクション試薬 (リポフェクション試薬を含む) 等と適宜組み合わせてもよい。これらは混ぜ合わさっていてもよく、使用時に混合されるまで分離されていてもよい。

本発明のポリペプチドを神経細胞に接触させることによって、神経の細胞死を抑制することができる。このとき、本発明のポリペプチドを細胞の外側から接触させる。例えば、細胞培養系であれば、培養液にポリペプチドを添加すればよい。*in vivo* で使用する場合は、細胞死の抑制の標的となる細胞にポリペプチドが接触し得るようにポリペプチドを投与すればよい。ポリペプチドの濃度は神経細胞死抑制活性の強弱や使用目的にもよるが、例えばHNと同等の活性を有するポリペプチドであれば約10 μ Mまたはそれより低い濃度で、HNGと同等の活性を有する

ポリペプチドであれば、約10nMまたはそれより低い濃度で最大の活性を示す。ポリペプチドが分泌性であるならば、細胞内に導入または発現しても、ポリペプチドが細胞外に分泌され、細胞死を抑制することができる。このためには、例えば本発明のポリペプチドをコードするDNAを細胞内で発現させればよい。本発明のポリペプチドを発現するベクターを細胞に導入することにより、細胞培養系または *in vivo* において神経細胞の細胞死を抑制することができる。また、分泌性の本発明のポリペプチドを発現する細胞との共培養、または *ex vivo* 投与などにより、周囲の細胞の細胞死を抑制することも可能である。

このように、本発明のポリペプチド、該ポリペプチドをコードするDNA、および該DNAを含むベクターは、神経細胞死を抑制するために用いられ得る。これらは神経細胞死抑制剤となる。また本発明は、本発明のポリペプチド、該ポリペプチドをコードするDNA、および該DNAを含むベクターの、神経細胞死を抑制するための使用を提供する。

本発明は、また、本発明のポリペプチド、または本発明のポリペプチドをコードするDNAが挿入されたベクターを有効成分とする医薬組成物を提供する。本発明のポリペプチドは、細胞に外から加えることにより、または分泌性のポリペプチドを細胞内で発現させることにより、神経変性を保護することができる。従って、本発明のポリペプチドは、特に神経変性を伴う疾患に対する医薬組成物として有用である。

実施例に示されるように、化学合成された Humanin (HN) ポリペプチドは、細胞外液の濃度が約10nM以上で神経細胞死を抑制する活性を示し、1~10 μ Mの濃度で最大の抑制活性を示した。また、HNGおよび AGA-HNG ポリペプチドは、約1nMで有意または十分な神経保護作用を示した。この神経保護作用は、これらのポリペプチドをコードするDNAを細胞へ導入して発現させることによってももたらされる。従って、本発明のポリペプチドを発現するベクターを医薬として用いて、遺伝子治療などを行うことも可能であると考えられる。遺伝子治療に用いる場合

は、分泌型のポリペプチド、または分泌シグナルを付加したポリペプチドを発現させることもできる。ベクターの投与方法は、*in vivo*であっても *ex vivo* であってもよい。遺伝子治療に用いるためのベクター系としては、アデノウイルスベクター、AAV（アデノ随伴ウイルス）ベクター、ヘルペスウイルスベクター（いずれも Robbins and Ghivizzani, Pharmacol. Ther. 80: 35-47, 1998）、レトロウイルスベクター（Engel and Kohn, Front. Biosci. 4: e26-33, 1999）、レンチウイルスベクター（Lundstrom, K., 1999, J. Recept. Signal. Transduct. Res. 19: 673-686）などを用いることが考えられるが、これらに制限されない。

本発明のポリペプチドまたは該ポリペプチドを発現するベクターを利用して予防や治療を行なう対象となる疾患としては、本発明のポリペプチドが疾患の治療に有効である限り、特に制限されない。好適な対象疾患としては、神経関連疾患、特にアルツハイマー病が挙げられる。これまでの研究からアルツハイマー病において神経細胞の細胞死が起こることが明らかにされている（I. Nishimoto et al., 1997, Adv. Pharmacol., 41: 337-368）。この細胞死には、APP（I. Nishimoto et al., 1998, Neurobiol. Aging., 19: S33-S38）やプレセニリン（Nishimura et al., 1999, Clin. Genet. 55: 219-225）のある種の活性化が関与していることが示唆されている。このため、本発明の医薬組成物は、アルツハイマー病における神経変性を保護する薬剤として用いられることが期待される。また、本発明の医薬組成物を用いて、アルツハイマー病以外にも、例えば脳虚血による神経細胞の細胞死に起因する疾患を予防することも可能である（T. Kirino, 1982, Brain Res., 239: 57-69）。その他、痴呆を伴うパーキンソン病（M.H. Polymeropoulos et al., 1997, Science, 276: 2045-2047）、びまん性レービー小体（Lewy bodies）病（M.G. Spillantini et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 6469-6473）、ダウン症に伴う痴呆なども、治療や予防の対象となる。また、APPの類縁分子である APLP1 が、先天性ネフローゼ症候群の原因遺伝子といわれている（Lenkkeri, U. et al., 1998, Hum. Genet. 102: 192-196）ことから、ネフローゼ

症候群などの腎疾患も治療や予防の対象となる。

本発明の医薬組成物は、有効成分自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化することも可能である。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、徐放剤などと適宜組み合わせて製剤化して投与することが考えられる。本発明の医薬組成物は、水溶液、錠剤、カプセル、トローチ、バッカル錠、エリキシル、懸濁液、シロップ、点鼻液、または吸入液などの形態であり得る。ポリペプチドの含有率は適宜決定すればよい。

患者への投与は、有効成分の性質に応じて、例えば経皮的、鼻腔内の、経気管支的、筋内の、腹腔内、静脈内、脊髄腔内、脳室内、または経口的に行われうるがそれらに限定されない。脳神経変性疾患の治療に用いる場合においては、本発明の医薬組成物は、静脈内、脊髄腔内、脳室内または硬膜内注射を含む任意の適当な経路で中枢神経系に導入するのが望ましい。投与量は、患者の年齢、体重、症状、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適宜適当な投与量を選択することが可能である。投与量、投与方法は、本発明の医薬組成物の有効成分の組織移行性、治療目的、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

例えば、アルツハイマー病治療などにおいて、脳神経細胞の変性保護を目的とした投与を行う場合には、本発明のポリペプチドが標的とする細胞周囲において神経変性を有効に抑制する濃度となるように投与されることが好ましい。すなわち、Humaninポリペプチドまたはこれと同等の神経細胞死保護作用を有するものであれば、少なくとも 1nM 以上、好ましくは 10nM 以上、より好ましくは 100nM 以上、より好ましくは 1 μ M 以上となるように投与されるべきである。HNG またはこれと同等の神経細胞死保護作用を有するものであれば、少なくとも 1pM 以上、好ましくは 10pM 以上、より好ましくは 100pM 以上、より好ましくは 1nM 以上となるように投与されるべきである。また AGA-HNG であれば、HNG の数分の一から十分の

一の濃度で同等の効果を期待できる。これらを達成するための投与量は、投与経路によって適宜決定することが可能である。

また、本発明は、本発明のポリペプチドに結合する抗体を提供する。本発明の抗体には、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体が含まれる。ポリクローナル抗体は、例えば HN や HNG などの本発明のポリペプチド、またはそれらの部分ペプチドを調製し、これを抗原にウサギ、ヤギ、ヒツジなどを免疫してポリクローナル抗体を作製する。抗原ペプチドは、適宜他のタンパク質、例えばキーホールリンベットヘモシアニンやアルブミンなどのキャリア蛋白質に結合させて免疫することができる。モノクローナル抗体は、免疫したマウスやラットの脾細胞を用い、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得ることにより作製することができる。抗体の作製は、公知の方法に従って行うことができる (Ed. Harlow and David Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。

ポリクローナル抗体は血清から、モノクローナル抗体ではハイブリドーマ培養上清またはハイブリドーマを接種した動物の腹水から硫酸分画、プロテイン G セファロースカラム、抗原を固定したアフィニティーカラムなどの一般的な生化学的手法で抗体を精製することができる。

これにより調製された抗体は、本発明のポリペプチドの吸収のために用いられる他、例えば、本発明のポリペプチドの構造変異の検査や診断、本発明のポリペプチドの発現量の検出などに利用することが可能である。

Humanin もしくは Humanin 様ペプチドの血中または神経組織を含む組織内濃度の低下が、AD を含む神経またはその他の臓器変性疾患の診断または予後判定に用いることができる可能性がある。例えば同じ AD 患者でも、血中の HN 活性の低い人は、高い人に比べ病気の進行が急速で、予後が不良である可能性が考えられる。検査方法としては、例えば抗 Humanin 抗体を用いた RIA 法により、血液または組織サンプル中の濃度を測定したり、生検材料を免疫組織染色法で検査することが

考えられる。また、例えば本発明のポリペプチドの投与による治療の際に、ポリペプチドレベルをモニターすることも考えられる。

本発明の抗体は、本発明のタンパク質に結合する限り、その抗体断片であってもよい。例えば、Fab、 $F(ab')_2$ 、Fv、またはそれらの修飾物が含まれる。また、ヒト型抗体もしくはヒト抗体なども含まれる。本発明の抗体を「本発明のポリペプチドの検査試薬」として用いる他、滅菌水、生理食塩水、緩衝剤、塩、安定剤、保存剤、界面活性剤、他の蛋白質（BSAなど）等と適宜組み合わせてもよい。これらは混ぜ合わさっていてもよく、使用時に混合されるまで分離されていてもよい。

本発明はまた、Humanin をコードするDNA（配列番号：4）またはその相補鎖に相補的な少なくとも15ヌクレオチドを含む、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の検出または操作に用いられるDNAを提供する。「遺伝子の検出」とは、遺伝子の存在の検出、変異の検出、および発現の検出などの遺伝子を基にする検出を意味する。また「遺伝子の操作」とは、遺伝子への変異導入、遺伝子の増幅、および遺伝子の発現抑制などの遺伝子操作を意味する。「遺伝子の検出または操作」には、遺伝子発現の検出、および発現制御が含まれる。ここで「相補鎖」とは、A:T、G:Cの塩基対からなる2本鎖DNAの一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも15個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、70%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上（例えば95%以上）の塩基配列上の同一性を有すればよい。配列の同一性は、例えば文献「Altschul, S. F. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410」に記載の方法に従って決定することができる。

このようなDNAには、本発明のペプチドをコードするDNAやRNAの検出や増幅に用いるプローブやプライマー、本発明のポリペプチドの発現を抑制するためのヌクレオチド又はヌクレオチド誘導體（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドやリボザイムをコードするDNA等）が含まれる。プライマーとして用いる場合、3'

側の領域を相補的にして、5'側には制限酵素認識配列やタグなどを付加することができる。

本発明は、また、本発明のポリペプチドによる細胞死の抑制活性を検出する方法を提供する。この方法は、(a)本発明のポリペプチドの存在下で細胞死を誘導する工程、および(b)細胞死を検出する工程、を含む方法である。具体的な操作は、本明細書に記載された方法に従って行うことができる。この方法は、本発明のポリペプチドが様々な細胞における細胞死に対して抑制効果を有するかどうかを決定したり、その抑制効果を定量するために用いられ得る。細胞としては特に制限はなく、細胞死を起し得るさまざまな細胞が用いられる。また、細胞死の誘導は、それぞれの細胞に応じて公知の細胞死誘導系をしようすることができる。また、神経細胞を用いて、神経細胞死を誘導するさまざまな刺激、環境変化、または遺伝子発現などの諸条件に対する本発明のポリペプチドの効果を検出するためにも用いられ得る。また、このような検出は、生物種や亜種、または個体間に存在し得る、神経細胞死における本発明のポリペプチドに対する感受性の違いを検出するために用いられ得る。これにより、例えば民族、人種、または個人間で、本発明のポリペプチドの有効性を検討することができる。このような方法により、例えば臨床適用に向けた詳細な条件検討を行うことができる。

また、本発明は、本発明のポリペプチドによる神経細胞死の抑制に対する化合物の効果を検出する方法を提供する。この方法は、(a)被検化合物および本発明のポリペプチドの存在下で神経細胞死を誘導する工程、および(b)神経細胞死を検出する工程、を含む方法である。この方法は、本発明のポリペプチドによる神経細胞死を促進したり抑制したりする化合物をアッセイするために用いられ得る。本発明のポリペプチドは、神経細胞表面に作用して細胞死抑制効果を発揮すると考えられる。この方法を用いれば、本発明のポリペプチドの細胞表面への接触を阻害し得る候補化合物や、逆に促進し得る候補化合物の作用を検証することができる。また、この検出方法を用いて、本発明のポリペプチドによる神経細胞

死の抑制を調節する化合物をスクリーニングすることも可能である。この方法は、(a)被検試料および本発明のポリペプチドの存在下で神経細胞死を誘導する工程、(b)神経細胞死を検出する工程、および(c)神経細胞死を促進または抑制する化合物を選択する工程、を含む。工程(c)においては、任意の対照における場合と比較することができる。例えば、工程(c)において、被検試料非存在下において検出した場合に比べ、被検試料存在下において神経細胞死を促進または抑制する化合物を選択することができる。神経細胞死を促進する化合物は、本発明のポリペプチドによる神経細胞死の抑制を阻害する化合物の候補となり、神経細胞死を抑制する化合物は、本発明のポリペプチドによる神経細胞死の抑制をさらに促進する化合物の候補となる。また、上記のスクリーニングにおいて、被検試料とは別の化合物における場合を対照とすることもできる。例えば本発明のポリペプチドによる神経細胞死の抑制を調節し得る別の化合物を用いて細胞死を検出し、工程(c)において、該化合物の存在下における場合に比べ、工程(a)で用いた被検試料存在下において神経細胞死を促進または抑制する化合物を選択することもできる。このようなスクリーニングにおいては、本発明のポリペプチドによる神経細胞死の抑制の調節能に関して、既存の化合物よりもさらに高い効果を有する化合物をスクリーニングすることができる。

スクリーニングに用いる被検試料としては、例えば、精製タンパク質（抗体を含む）、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成ペプチドのライブラリー、細胞抽出液、細胞培養上清、合成低分子化合物のライブラリー、土壌などの天然材料、放線菌ブロースなどの細菌放出物質を含む溶液などが挙げられるが、これらに制限されない。

神経細胞死の誘導や本発明のポリペプチドの投与は、実施例に従って行うことができる。被検試料を細胞に適用するタイミングに特に制限はなく、本発明のポリペプチドを適用する前、後、または同時に適用することができる。被検試料の適用方法に制限はなく、培養細胞系であれば、例えば培地に添加される。また核

酸であれば、細胞内に導入されてもよい。その他、任意の投与方法により、被検試料を適用することができる。

上記の化合物の作用の検査により評価された化合物、あるいはスクリーニングにより得られた化合物は、本発明のポリペプチドの活性を調節する化合物の候補となり、アルツハイマー病を含む疾患の予防や治療への応用が考えられる。

また、本発明は、本発明のポリペプチドに結合する化合物のスクリーニング方法を提供する。このようなスクリーニングは、(a)本発明のポリペプチドに被検試料を接触させる工程、(b)本発明のポリペプチドと被検試料との結合活性を検出する工程、および(c)本発明のポリペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法により実施することが可能である。

本発明のポリペプチドは、スクリーニングの手法に応じて、可溶性ポリペプチドとして、また担体に結合させた形態としてスクリーニングに用いることができる。本発明のポリペプチドは標識されていてもよい。標識としては、放射性同位元素による標識、蛍光物質による標識、ビオチンやジゴキシゲニンによる標識、タグ配列の付加などが挙げられる。

スクリーニングに用いる被検試料としては、例えば、精製タンパク質（抗体を含む）、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成ペプチドのライブラリー、細胞抽出液、細胞培養上清、合成低分子化合物のライブラリー、土壌などの天然材料、放線菌ブ羅斯などの細菌放出物質を含む溶液などが挙げられるが、これらに制限されない。被検試料は、必要に応じて適宜標識して用いられる。標識としては、例えば、放射標識、蛍光標識などが挙げられるが、これらに制限されない。

例えば、本発明のポリペプチドと結合するタンパク質をスクリーニングする場合は、本発明のポリペプチドを固定したアフィニティーカラムに本発明のポリペプチドと結合するタンパク質を発現していることが予想される組織または細胞の細胞抽出物をのせ、カラムに特異的に結合するタンパク質を精製することにより、本発明のポリペプチドに結合するタンパク質のスクリーニングを実施すること

が可能である。

さらに、本発明のポリペプチドと結合するタンパク質を発現していることが予想される組織若しくは細胞（例えば 脳皮質組織、または F11などの神経細胞）よりファージベクターを用いたcDNAライブラリーを作製し、アガロース上にブラークを形成させ、標識した本発明のポリペプチドを用いてウエストウエスタンブロットティング法によりスクリーニングしたり、GAL4 DNA結合領域などの DNA結合ペプチドおよびGAL4転写活性化領域などの転写活性化ペプチドを、それぞれ本発明のポリペプチドおよび被検タンパク質との融合タンパク質として発現させ、DNA結合ペプチドの結合配列を有するプロモーターの下流に連結させたレポーター遺伝子の発現を通して本発明のタンパク質と被検タンパク質との結合を検出する「twoハイブリッドシステム」等に従い実施することも可能である。

本発明のスクリーニングにより、本発明のポリペプチドに対する受容体をクローニングすることも考えられる。この場合、被検試料は受容体を発現していることが予想される組織または細胞、例えば脳皮質組織、神経細胞株、または神経芽細胞腫や奇形腫細胞などから調製することが好ましい。神経細胞株としては、例えば F11細胞、PC12細胞 (L. A. Greene および A. S. Tischler, 1976, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73: 2424-2428)、NTERA2細胞(J. SkowronskiおよびM. F. Singer, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 6050-6054)、SH-SY5Y細胞(L. Odelstad et al., 1981, Brain Res., 224: 69-82)等が挙げられる。

また、固定化した本発明のポリペプチドに、合成化合物、天然物バンク、もしくはランダムファージペプチドディスプレイライブラリーなどを作用させ、結合する分子をスクリーニングすることも考えられる。また、表面プラズモン共鳴現象を利用した結合の検出によるスクリーニングも可能である（例えば ビアコア (BIAcore社製)など）。これらのスクリーニングは、コンビナトリアルケミストリー技術を用いたハイスループットスクリーニングにより行うことも可能である。

本発明のスクリーニングにより得られた本発明のポリペプチドに結合する化合

物は、本発明のポリペプチドの活性を調節する化合物の候補となり、アルツハイマー病を含む疾患の予防や治療への応用が考えられる。

図面の簡単な説明

図1は、Humanin cDNA クローンにおける、V642I APPによる細胞死をアンタゴナイズする活性をコードする領域を示す図である。

DNA断片を、最も長い配列（-934から600；1番目の塩基は Humanin ORF の最初の塩基に対応し、その1塩基前は -1 である）に対して整列させた。V642I APPにより誘導される F11/EcR 細胞の細胞死に対するそれらの活性を横に示す。F11/EcR 細胞に V642I APP をコードする pIND (1 μ g) と共に、1 μ gの pEF-BOS またはそれぞれのDNA断片をコードする pEF-BOS を3時間トランスフェクトし、続いてエクダイソンで72時間処理した。トリバンプルー排除アッセイにより細胞死を測定した。pEF-BOS をトランスフェクトした細胞とそれぞれのDNA断片をトランスフェクトした細胞との間で、細胞死に統計的に有意な差があった場合、このDNA断片にはアンタゴナイズ活性があると判定し、“Y”で示した。“N”は有意なアンタゴナイズ活性がなかったことを示す。

図2は、エクダイソンにより誘導される V642I APP の発現による神経細胞死における DT63 と DT171 クローンの効果を示す図である。F11/EcR 細胞に、エクダイソン誘導型 V642I APP プラスミドと共に、pEF-BOS、DT63、またはDT171 (DT63 とDT171は pEF-BOS にクローン化されている)をトランスフェクトし、Ponasterone (エクダイソン) 処理を行った。エクダイソン処理を行わない群も設定した。エクダイソン処理の 72 時間後、トリバンプルー排除アッセイにより細胞死を測定した。また、エクダイソン処理を行わない群も同様に測定した。図中のエラーバーのある数値は、3回の独立したトランスフェクションの結果の平均 \pm S.D.を表す。DT63とDT171は図1に示されている。

図3は、FAD遺伝子の発現により誘導される神経細胞死における DT63 クローン

の効果を示す図である。F11細胞に pcDNA または V642I APP、NL-APP、M146L PS-1、もしくは N141I PS-2をコードする pcDNA と共に、pEF-BOS (vec) または DT63 をコードする pEF-BOS をトランスフェクトし 72時間培養した。細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。図中のエラーバーのある数値は、3回の独立したトランスフェクションの結果の平均±S.D.を表す。

図4は、FAD遺伝子のトランスフェクションによる F11 細胞の細胞死における DT29、DT44、および DT171 クロンの効果を示す図である。図3と同様に、F11細胞に pcDNA または V642I APP、NL-APP、M146L PS-1、もしくは N141I PS-2をコードする pcDNA と共に、pEF-BOS (pBOS) または DT クロンをコードする pEF-BOS をトランスフェクトし 72時間培養した。細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。DT29とDT44は図1に示されている。3つの実験を同時に行ったところ、ベーサルな細胞死の比率(トランスフェクションなし、pcDNA+pBOS)は共通していた。同様の実験は少なくとも3回行った。図中のエラーバーのある数値は平均±S.D.を表す。

図5は、FAD遺伝子の発現により誘導される神経細胞死における、Humaninをコードするプラスミド pHN の効果を示す図である。F11細胞に空ベクター (pcDNA) または V642I APP、NL-APP、M146L PS-1、もしくは N141I PS-2をコードする pcDNA と共に、pFLAG または HN をコードする pFLAG (pHN) をトランスフェクトし 72時間培養した。細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。値は3回の独立した実験結果の平均±S.D.を表す。

図6は、V642I APPにより誘導される神経細胞死における、pHN をトランスフェクトしたF11細胞からの培養上清の抑制効果を示す図である。F11細胞に pcDNA または V642I APPをコードする pcDNA を血清非存在下で3時間トランスフェクトし、18%FBSを含む HamF-12 で2時間培養した後、CM/F11-pHN (CM/pHN)、CN/F11-vec (CM/vec)、または新鮮な培地 (18%FBSを含む新しい HamF-12) で67時間培養した。トランスフェクション 72時間後に、トリパンブルー排除アッセイにより細

胞死を測定した。値は3回の独立した実験結果の平均 \pm S.D.を表す。 $p<0.01$ はStudentのt検定による。

図7は、pHNをトランスフェクトしたF11細胞の培養上清に含まれるHNポリペプチドの免疫反応性を示す写真である。左と中央のパネルは、細胞抽出液(30 μ g protein)および培養上清(20 μ l)をTris/Tricineゲル電気泳動後、抗FLAG抗体を用いたイムノブロットを行った結果を示す(1:トランスフェクションなしの細胞; 2:pFLAGをトランスフェクトした細胞; 3:pHNをトランスフェクトした細胞)。右のパネルは、pHN、pHNG、またはpHNAをトランスフェクトした細胞の培養上清を同様に解析した結果である。右の3レーンは、培養上清中に含まれるHNポリペプチドのタイターを決定するために、図示した濃度のsHN-FLAG(MAPRGFSCLLLLTSEIDLVPVKRRAGTDYKDDDDK:下線はFLAGタグ)(配列番号:6)のイムノブロットを行った結果を示す。同様の実験は4回以上繰り返した。

図8は、HNポリペプチドおよびその変異体の細胞からの分泌を解析した結果を示す写真である。上パネル:L9R変異によりHNが細胞外に分泌されなくなることを示す図である。F11細胞にpHN、pHNA、またはpHNR(L9R HNをコードするpFLAG)をトランスフェクトし、72時間後に細胞抽出液および培養上清を回収し、図7と同様に抗FLAG抗体を用いて解析した。

下パネル:HNのシグナル配列様分泌活性を示す図である。EGFP cDNA(レーン2)、HN-EGFP融合cDNA(レーン3)、またはHNR-EGFP cDNA(レーン4)をF11細胞にトランスフェクトし、72時間後に細胞抽出液(左下パネル, 10 μ g/レーン)または培養上清(右下パネル, 20 μ g/レーン)を抗EGFPポリクローナル抗体(1/2000)およびHRP結合抗ウサギIgG抗体(1/5000)を用いたイムノブロットにより解析した。両パネルのレーン1はトランスフェクションを行わなかったF11細胞由来の資料をブロットした結果を示す。左のバーに分子量をダルトンで示した。

図9は、V642I APPにより誘導される神経細胞死における、合成HN(sHN)およびその構造的誘導体の効果を示す図である。F11細胞にV642I APPをコードする

pcDNA をトランスフェクトし、様々な濃度の sHN (元々の HN) (配列番号 : 5) 、sHNG (S14G) (配列番号 : 8) 、sHNA (C8A) (配列番号 : 9) 、C8を介した sHN のダイマー型 (C8-C8) 、および C 末の KRRA を AAAA に置換した sHN (KRRA21/22/23/24AAAA) (配列番号 : 10) で処理した。トランスフェクション 72 時間後に、トリバンプルー排除アッセイにより細胞死を測定した。3 回の独立した実験の平均±S.D.を示す。

図 10 は、M146L PS-1、N141I PS-2、または NL-APP により誘導される神経細胞死における sHN、sHNG、または sHNA の効果を示す図である。図 9 と同様に、M146L PS-1、N141I PS-2、または NL-APP cDNA をトランスフェクトした F11 細胞を、様々な濃度の sHN (元々の HN)、sHNG (S14G)、または sHNA (C8A) で処理した。トランスフェクション 72 時間後に、トリバンプルー排除アッセイにより細胞死を測定した。3 回の独立した実験の平均±S.D.を示す。

図 11 は、FAD 遺伝子の発現により誘導される神経細胞における pHN、pHNG、または pHNA の効果を示す図である。F11 細胞に空ベクター (pcDNA) または V642I APP、NL-APP、M146L PS-1、もしくは N141I PS-2 をコードする pcDNA と共に、pFLAG または HN をコードする pFLAG (pHN、pHNG、または pHNA) をトランスフェクトし 72 時間培養した。細胞死をトリバンプルー排除アッセイにより測定した。3 回の独立した実験の平均±S.D.を示す。

図 12 は、ポリグルタミンリピート Q79 により誘導される神経細胞死における HN およびその構造的誘導体の効果の欠如を示す図である。図は全て 3 回の独立した実験の平均±S.D.を示す。

A: エクダイソンで誘導される Q79 の発現により引き起こされる神経細胞死における、pHN、pHNG、または pHNA の効果の欠如。F11/EcR 細胞に、エクダイソン誘導型 Q79 発現プラスミドと共に、空ベクター (pFLAG)、または pHN、pHNG、もしくは pHNA をトランスフェクトし、エクダイソン存在下 (+) または非存在下 (-) で 72 時間培養した。細胞死をトリバンプルー排除アッセイにより測定した。

B: エクダイソンで誘導される NL-APP、V642I APP、M146L PS-1、または N141I PS-2 の発現により引き起こされる神経細胞死における、pHNのコトランスフェクションによる有意な抑制効果。A と同じ条件で、F11/EcR 細胞に、エクダイソン誘導型FAD遺伝子プラスミドと共に、pFLAG または pHN をトランスフェクトし、エクダイソン存在下(+)または非存在下(-)で 72時間培養した。細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。

C: エクダイソンで誘導される Q79 の発現により引き起こされる神経細胞死における、sHN、sHNG、または sHNA の効果の欠如。F11/EcR 細胞に、エクダイソン誘導型 Q79 プラスミドをトランスフェクトし、1 μ M の sHN、sHNG、または sHNA で処理し、その後エクダイソン存在下(+)または非存在下(-)で培養した。エクダイソン処理開始の72時間後に細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。

D: エクダイソンで誘導される NL-APP、V642I APP、M146L PS-1、または N141I PS-2 の発現により引き起こされる神経細胞死における、sHNの有意な抑制効果。C と同じ条件で、F11/EcR 細胞に、エクダイソン誘導型FAD遺伝子プラスミドをトランスフェクトし、1 μ MのsHNで処理した後、エクダイソン存在下(+)または非存在下(-)で培養した。エクダイソン処理開始の72時間後に細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。

図 1 3 は、ALS関連SOD1変異体により誘導される神経細胞死におけるHNおよびその構造的誘導体の効果の欠如を示す図である。図は全て 3 回の独立した実験の平均 \pm S.D.を示す。

A: ALS関連SOD1変異体の発現により誘導される神経細胞死における、pHNのコトランスフェクションの効果の欠如。F11 細胞に、ALS関連変異 SOD1 (SOD1 の A4T、G85R、またはG93A 変異体) をコードする pEF-BOSを、空ベクター (pFLAG)、または pHN と共にトランスフェクトした。細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。

B: ALS関連SOD1変異体の発現により誘導される神経細胞死における、sHN、sHNG、または sHNA の効果の欠如。F11 細胞に、A4T、G85R、またはG93A SOD1 をコードする pEF-BOSをトランスフェクトし、100 μ M の sHN、sHNG、または sHNA で処理した。その後、細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。

図 1 4 は、 $A\beta$ により誘導される初代培養神経の細胞死における HN の効果を示す位相差顕微鏡像を示す写真である。代表的な観察像を示した。初代培養皮質神経を、sHN (10nM, 10 μ M)、10nM sHNG、または 10 μ M sHNA の存在下または非存在下で 25 μ M の $A\beta$ 1-43 で 72 時間処理した。 $A\beta$ 1-43処理の開始16時間前に、図示した最終濃度のHNポリペプチドを 1 回添加した。 $A\beta$ 1-43の添加は、まず培地の半分を除去し、上記と同じ濃度のsHNまたはsHNAと50 μ Mの $A\beta$ 1-43とを含む新鮮な培地を除去した培地と等量補充することによって行った。 $A\beta$ 処理しない未処理 (no treatment) の細胞も観察した。同様の実験は少なくとも3回行い、再現性のある結果を得た。

図 1 5 は、 $A\beta$ により誘導される初代培養神経の細胞死における HN の効果を示す図である。初代培養皮質神経を、図示した濃度の sHN、sHNG、または sHNA の存在下または非存在下で 25 μ M の $A\beta$ 1-43を添加した。HNポリペプチドの添加は図 1 4 と同様に行った。 $A\beta$ 処理の開始から72時間後に細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。これらの実験の際、ポジティブコントロールとして、初代培養神経を 10 μ M sHN または HN誘導体の存在下または非存在下、20 μ M のエトポサイドで72時間同様に処理した。同様の実験は少なくとも3回行い、再現性のある結果を得た。図は 3 回の独立した実験の平均 \pm S.D.を示す。

図 1 6 は、 $A\beta$ により誘導される初代培養神経の細胞死における HN の効果を示す図である。培養液中に放出されたLDH量により細胞傷害性をモニターした。初代培養皮質神経を、図示した濃度の sHN、sHNG、または sHNA の存在下または非存在下で 25 μ M の $A\beta$ 1-43を添加した。HNポリペプチドの添加は図 1 4 と同様に行った。 $A\beta$ 処理開始の24、48、または72時間後に培養液中のLDH量を測定した。HN

ポリペプチドの存在下または非存在下で20 μ Mのエトボサイドで処理した神経からのLDH放出も測定した。同様の実験は少なくとも3回行い、再現性のある結果を得た。図は3回の独立した実験の平均 \pm S.D.を示す。

図17は、A β 1-43により誘導される初代培養神経の細胞死におけるHNの効果を示す写真である。Calcein-AM染色の結果を蛍光顕微鏡像で示す。初代培養皮質神経を、図示した最終濃度のHNポリペプチドの存在下または非存在下で25 μ MのA β 1-43を添加した。HNポリペプチドの添加は図14と同様に行った。A β 1-43処理の72時間後にCalcein-AMで染色を行った。A β 処理しない未処理の細胞（no treatment）も観察した。細胞質における蛍光は生細胞であることを表す。同様の実験は少なくとも3回行い、再現性のある結果を得た。図は代表的な結果を示す。

図18は、Calcein-AM染色の蛍光測定の結果を示す図である。初代培養皮質神経を、図示した最終濃度のHNポリペプチドの存在下または非存在下で25 μ MのA β 1-43を添加した。HNポリペプチドの添加は図14と同様に行った。A β 1-43処理の72時間後にCalcein-AMで染色を行い、蛍光強度を測定した。基底状態の蛍光強度は36960 (unit/well) と計算され、これを各値から差し引いた。同様の実験は少なくとも3回行い、再現性のある結果を得た。図は3回の独立した実験の平均 \pm S.D.を示す。

図19は、ヒトの様々な組織中でのHN mRNAの発現を示す写真である。ヒト組織のポリA-RNAがプロットされたシートに放射標識したアンチセンスHN (a)、5'領域をコードする19mer (b)、またはDT77 (c) をプローブとしてハイブリダイズさせた(1:脳、2:心臓、3:骨格筋、4:大腸、5:胸腺、6:脾臓、7:腎臓、8:肝臓、9:小腸、10:膵臓、11:肺、12:末梢血白血球)。(d)は同じシートを、 β -actinをプローブにしてノーザンプロットを行った結果を示す。左側の数字は分子量サイズを示す。同様の実験は少なくとも3回行い、これと同様の結果を得た。

図20は、マウス組織でのHN mRNAの発現を示す写真である。マウスの様々な器

官から抽出したポリA-RNA (2 μ g/レーン) を1.2%アガロースゲルで電気泳動し、プロット後、標識したアンチセンスHN (左上) または β -actin (左下) をプローブにしてハイブリダイゼーションを行った (1:脳、2:心臓、3:骨格筋、4:胸腺、5:脾臓、6:腎臓、7:肝臓、8:小腸、9:胃、10:皮膚、11:肺)。

右のパネルはマウス脳におけるHN mRNAの発現領域を示す図である。マウス脳の様々な領域由来のポリA-RNAがプロットされたシート (1:前頭葉、2:側頭葉、3:頭頂葉、4:後頭葉、5:小脳、6:肺) に、標識したアンチセンスHN (右上) または β -actin (右下) プローブをハイブリダイズさせた。シート間で量的な比較ができるように、左パネルと同じ量の肺由来のポリA-RNAをレーン6に泳動してハイブリダイゼーションを行った。

図21は、HNの防御活性における構造/機能関係の詳細な解析結果を示す図である。図は V642I APP により誘導される神経細胞の細胞死におけるHN欠失誘導体の効果を示す。図9に示したように、各合成HN誘導体の存在下または非存在下でF11細胞に V642I APP cDNA をトランスフェクトし、72時間後に細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。左上のパネルは、図示したようなN末端欠失HNの試験結果を示す。右上のパネルは、図示したような、 Δ N2 HNのC末端欠失ポリペプチドの試験結果を示す。3回の独立した実験の平均 \pm S.D.を示す。このパネルに示された実験により得られた結果を下のパネルにまとめた。

図22は、4種の異なるFAD遺伝子により引き起こされる神経細胞死における Δ N3 HNおよびHN-17の効果を示す図である。10 μ M の Δ N3 HNまたはHN-17の存在下または非存在下、F11細胞に V642I APP、NL-APP、M146L PS-1、またはN141I PS-2 cDNAをトランスフェクトし、72時間後にトリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した (左上パネル)。右上のパネルと下のパネルは、FAD遺伝子による神経細胞死の抑制におけるHN-17の効果の用量-応答曲線を示す。図のように段階的に濃度を増加させた合成HN-17の存在下または非存在下で、F11細胞に各FAD遺伝子 (V642I APP、NL-APP、M146L PS-1、またはN141I PS-2 cDNA) を同様にし

てトランスフェクトした。72時間後にトリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した。「no Tx」はFAD遺伝子をトランスフェクションしていない細胞の結果。各図は全て3回の独立した実験の平均±S.D.を示す。

図23は、4種の異なるFAD遺伝子およびAβ1-43により引き起こされる神経細胞死に対する HNG-17のAla置換体 (Ala-scanned HNG-17) の効果を示す図である。10nM のAla置換された HNG-17 の存在下または非存在下、初代培養神経を 25 μMのAβ1-43で処理 (左上パネル) するか、またはF11細胞に V642I APP、NL-APP、M146L PS-1、またはN141I PS-2 cDNAをトランスフェクト (他のパネル) し、72時間後にトリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した。それぞれのAla置換 HNG-17 で細胞死アンタゴナイズ効果の検出を行った。置換残基はグラフの下に示している。それぞれのAla置換体のアミノ酸配列は、順に配列番号: 25 ~ 41に示した。例えば、左上パネルにおいて、10nM の ARGFSCLLLLTGEUDLP (下線を引いたAはPから置換された) (配列番号: 25) の存在下で初代培養神経を 25 μM Aβ1-43で72時間インキュベートした場合、細胞死の比率は 75.3±4.4% (3回の独立した実験の平均±S.D.) で、Aβ1-43によるインキュベーションにおける細胞死の比率 (76.1±4.7%) と同等であった。10nM の HNG または HNG-17 の存在下で神経を 25 μM Aβ1-43とインキュベートした場合は、細胞死の比率はそれぞれ 29.3±0.9%または 28.8±1.3%であり、基底状態における細胞死の比率 (30.0±1.6%) と同等であった。「no T」はFAD遺伝子をトランスフェクションしていない細胞、「vec」は空ベクターをトランスフェクトした細胞、「no」はポリペプチドで処理していない細胞の結果を示す。各図は全て3回の独立した実験の平均±S.D.を示す。

図24は、HNGの8位のCysを他のアミノ酸に置換したHNG変異ポリペプチドの細胞死抑制効果を示す図である。

上パネル: F11細胞をそのまま、またはF11細胞にV642I-APP cDNA (1 μg) をトランスフェクトし、C8を他の可能な19アミノ酸残基のうちの1つに置換 (図中、

一文字表記で示した)したHNG変異ポリペプチド(10nM)のいずれかで処理した。トランスフェクション開始の72時間後にトリバンプルー排除アッセイにより細胞死の比率を測定した。「no T」はトランスフェクションなし、「vec」は空のpcDNAベクターのトランスフェクションを表し、ポリペプチド処理を行わなかった結果を示している。「C」はもともとのHNGを表す(配列番号:8)。「A」はHNAである(配列番号:9)。「D」~「Y」までのポリペプチドのアミノ酸配列は、順に配列番号:42~59に示す。細胞死の比率の値は3回の独立の実験の平均±S.D.で示した。全細胞中の死細胞の割合(%死細胞)を表す。

中央パネル:F11細胞をそのまま、または1 μ gのFAD遺伝子(左はK595N/M596L-APP;中央はM146L-PS-1;右はN141I-PS-2)をトランスフェクトし、C8を図示したアミノ酸残基に置換したHNG変異ポリペプチド(10nM)のいずれかで処理した。トランスフェクション開始の72時間後にトリバンプルー排除アッセイにより細胞死の比率を測定した。「no T」はトランスフェクションなし、「vec」は空のpcDNAベクターのトランスフェクションを表し、ポリペプチド処理を行わなかった結果を示している。値は3回の独立の実験の平均±S.D.で示した。

下パネル:初代培養皮質神経を、C8を図示したアミノ酸残基に置換したいずれかのHNG変異ポリペプチド(10nM)の存在下、25 μ MのA β 1-43で処理した。A β 処理開始の72時間後にトリバンプルー排除アッセイにより細胞死の比率を測定し(左パネル)、カルセイン染色による生細胞のアッセイを行った(右パネル)。値は3回の独立の実験の平均±S.D.で示した。

図25は、4種の異なるFAD遺伝子およびA β 1-43により引き起こされる神経細胞死に対するAGA-HNG(配列番号:60)の効果を示す図である。様々な濃度のAGA-HNGの存在下または非存在下、初代培養神経を25 μ MのA β 1-43で処理(パネルB)するか、またはF11細胞にV642I APP、NL-APP、M146L PS-1、またはN141I PS-2 cDNAをトランスフェクト(パネルC~F)し、72時間後にトリバンプルー排除アッセイにより細胞死を測定した。A β を用いた初代培養神経の実験においては、コン

トロールとして様々な濃度の HNG を用いて同様の実験を行った。「no T」はトランスフェクションしていない細胞、「pcDNA」は空ベクターをトランスフェクトした細胞の結果である。各パネルは全て3回の独立した実験の平均±S.D.を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって何ら制限されるものではない。本実施例に記載された実験方法を以下に示す。

V642I APP cDNA は以前記載されている (Yamatsuji, T. et al. (1996) Science 272, 1349-1352)。PS-1 cDNA の M146L変異体および PS-2 cDNA の N141I 変異体は、それぞれ Peter St. George-Hyslop博士 (Sherrington, R. et al. (1995) Nature 375, 754-760)、および Luciano D'Adamo博士 (Wolozin, B. et al. (1996) Science 274, 1710-1713) より寄贈された。本実施例で用いた全てのFAD遺伝子は pcDNA ベクター (Funk, C.D. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 5638-5642) にコードされている。SOD1 cDNA の ALS関連変異体 (A4T、G85R、G93A) (Takahashi, H. et al. (1994) Acta Neuropathol. 88, 185-8)、および pDN-E/G5H-Q79 は、それぞれ Shoji Tsuji博士 (Niigata University School of Medicine, Niigata, Japan)、および Akira Kakizuka博士 (Osaka Biomedical Research Center, Osaka, Japan) より寄贈された。

Humanin をコードするプラスミド pHN は、HN cDNA を pFLAG-CMV-5aベクター (pFLAG) (Eastman Kodak) のポリクローニングサイトに挿入して構築した。すなわち、pFLAG-CMV-5aプラスミドを EcoRI および KpnI で切断し、HNをコードするセンスオリゴヌクレオチド (5'-AATTCACCATGGCTCCACGAGGGTTCAGCTGTCTCTTACTTTT AACCAAGTGAAATTGACCTGCCCCGTGAAGAGCGGGCAGGTAC-3' / 配列番号: 1) とアンチオリゴヌクレオチド (5'-CTGCCCGCCTCTTCACGGGCAGGTCAATTTCACTGGTTAAAGTAAGAGACAG CTGAACCTCGTGGAGCCATGGTG-3' / 配列番号: 2) をライゲーションした。このプラ

スミドは、FLAGタグ (DYKDDDDK) がC末端に融合したHumaninポリペプチドを発現する。

変異HNをコードする pFLAGプラスミド (pHNGおよびpHNA) は、pHNから Quick Change Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を用いて構築した。配列は、直接塩基配列決定法により確認した。HN-EGFPプラスミドの構築には、まずHNをコードするセンスおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドをリン酸化した後、95°C3分でアニーリングさせ、pEGFP-N3ベクター (Clontech laboratories) の EcoRI-KpnI部位に T4 DNAライゲースによりサブクローニングした。合成 HN ポリペプチド (sHN) および構造改変した合成ポリペプチドは95%以上に精製したものをを用いた。合成HN (sHN) および他の幾つかの合成HN誘導ポリペプチドは2箇所の入手経路から独立して入手したが、どちらも本質的に同じ結果が得られた。抗FLAG抗体は Eastman Kodak (M2モノクローナル抗体, Cat. #IB13010) から購入した。A β 1-43 は BACHEM (Cat. #H-1586) より購入した。他の試薬は全て商業的に入手可能なものを用いた。

pEF-BOSにコードされた発現cDNAライブラリーは、研究所のガイドラインに従って、生検により孤発性ADであることが確認された患者の脳試料 (後頭皮質) からポリA⁺ RNAを抽出して構築した。ポリA⁺ RNAは、NotI部位を含む改変オリゴdTプライマーを用いて逆転写した。二本鎖cDNAにEcoRI-BstXIアダプタープライマー (5'-pGAA TTC ACC ACA-3' および 3'-CTT AAG GTGp-5') をライゲートし、NotIで切断した。低分子DNAを除いた後、cDNAは pEF-BOS の BstXI-NotI 断片にライゲートし、エレクトロポレーションにより XL1 Blue MRF' 株へ形質転換した。初代ライブラリーサイズおよび挿入断片の平均サイズはそれぞれ 3.2×10^6 cfu/16ml および 0.9kb であった。

F11細胞 (Platika, D. et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 3499-3503; Yamatsuji, T. et al. (1996) Science 272, 1349-1352) は、18%ウシ胎児血清(FBS)および抗生物質を含む HamF-12 培地で培養した。6ウェルプレー

ト上に 7×10^4 /ウェルのF11細胞を播き、18% FBSを含む HamF-12 培地で 12~16 時間培養した後、FAD遺伝子をコードするプラスミドを、HNをコードするプラスミド (pHN等) と共に、リポフェクションにより血清の非存在下 3 時間トランスフェクトし (FAD cDNA 発現プラスミド $1 \mu\text{g}$ 、HN cDNA 発現プラスミド $1 \mu\text{g}$ 、LipofectAMINE $4 \mu\text{l}$ 、Plus試薬 $8 \mu\text{l}$)、18% FBSを含む HamF-12 培地で 2 時間培養した。その後培地を 10% FBSを含む HamF-12 培地に交換し、さらに67時間培養した。トランスフェクションから72時間後、トリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した。合成 HN ポリペプチドを用いた実験では、F11細胞 (6 ウェルプレート上で 7×10^4 /ウェル) に血清非存在下で上記と同様に FAD遺伝子を 3 時間トランスフェクトし、18% FBSを含む HamF-12 培地で 2 時間培養した後、様々な濃度の HN ポリペプチドと共に 10% FBSを含む HamF-12 培地で 67時間培養し、トリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した。SOD1のALS関連変異体 cDNA も同様にトランスフェクトし、その神経毒性の試験を行った。

pHNをトランスフェクトした F11細胞の培養上清 (CM/F11-pHN) を得るためには、F11細胞に pHN をリポフェクションにて血清非存在下で 3 時間トランスフェクトし (pHN $1 \mu\text{g}$ 、LipofectAMINE $2 \mu\text{l}$ 、Plus試薬 $4 \mu\text{l}$)、18% FBSを含む HamF-12 培地で 2 時間培養した。その後培地を 10% FBSを含む HamF-12 培地に交換し、さらに67時間培養した。この培養培地を 1 回凍結融解して CM/F11-pHN とした。CM/F11-vecは、pFLAGをトランスフェクトしたF11細胞から同様にして調製した。CM/F11-pHN、CM/F11-pHNG、および CM/F11-pHNA のイムノブロット解析では、凍結融解しない培養培地にプロテアーゼインヒビターカクテル (Boehringer Mannheim, Cat. #1697498; 2mlの蒸留水に1錠を溶かし、試料の 1/25 容を添加した) を加えた。細胞のライセートを用いたイムノブロット解析では、細胞をPBSで2回洗浄し、 $30 \mu\text{l}$ のホモジェナイジングバッファー [10mM Tris/HCl (pH7.5), 1mM EDTA, 1% Triton X-100, および 1錠/50mlのプロテアーゼインヒビターカクテル] 中に懸濁した。2 回凍結融解した後、細胞のホモジェネートを4℃で

15,000rpmで10分遠心し、上清をTris/Tricineゲル電気泳動してイムノプロット解析に供した。Tris/Tricineゲル電気泳動は、以前記載されたように行った (Schagger, H. and von Jagow, G. (1987) Analytical Biochemistry 166, 168-179)。

F11/EcR/V642I 細胞は、エクダイソン誘導型 V642I APP 発現プラスミドを用いて樹立した。まず、共発現ベクター pVgRXR (Invitrogen) を F11細胞に導入し、それに続くZeocin選択により、エクダイソン受容体 EcR とレチノイドX受容体 RXR の両方を安定に過剰発現する F11細胞 (F11/EcR細胞) を樹立した。多コピーのエクダイソン応答配列を有する pIND ベクター (Invitrogen) に V642I APP cDNA を挿入し、F11/EcR細胞にトランスフェクトした後、G418選択を行った。限界希釈により、F11/EcR/V642I 細胞をクローニングした。F11/EcR/V642I 細胞は、18% FBS と抗生物質を含む HamF-12 培地で培養した。エクダイソン処理の前に、細胞を 10% FBS存在下で 24 時間培養した。その後、10% FBS存在下で細胞培養液にエクダイソン (40 μ M Ponasterone; Invitrogen Cat. #H101-01) を添加した。エクダイソン処理に応答して、各F11/EcR/V642I 細胞で細胞死が起こり、全細胞中の細胞死の比率は処理後 72 時間で 60~70%、処理後 96 時間で80~90%に達した。F11/EcR/V642I 細胞の更に詳細な解析は、別途記載されている (国際公開番号 W000/14204参照)。

エクダイソンを用いた F11/EcR細胞の実験では、F11/EcR細胞を 6 ウェルプレートに 7×10^4 /ウェルで播き、18% FBSを含む HamF-12 培地で 12~16 時間培養し、エクダイソン誘導型プラスミド 1 μ gを単独で、または HNをコードするプラスミド 1 μ g と共に、血清非存在下で上記と同様に 3 時間トランスフェクトした。18% FBSを含む HamF-12 培地で 12~16 時間培養した後、細胞を10% FBSを含む HamF-12 培地で 2 時間培養し、エクダイソン (Ponasterone) を培地に添加した (終濃度 40 μ M)。エクダイソンで処理後72時間での細胞死を測定した。合成 HN ポリペプチドを用いた実験では、細胞に FAD遺伝子を血清非存在下で 3 時間同様に

トランスフェクトし、18% FBSを含む HamF-12 培地で 12~16 時間培養し、様々な濃度の HN ポリペプチドと 10% FBSを含む HamF-12 培地で 2 時間培養し、40 μ M の Ponasterone を培地に添加した。エクダイソンで処理後72時間での細胞死を、トリバンプルー排除アッセイにより測定した。HD/SCA関連 Q79 cDNA も同様にトランスフェクトし、その神経毒性の試験を行った。

マウス皮質神経の初代培養は、ポリ-D-リジンコートした 24ウェルプレート (Sumitomo Bakelite) を用い、血清非存在下およびN2サブプリメントの存在下で、以前記載されたように行った (Eksioglu, Y. Z. et al. (1994) Brain Res. 644, 282-90)。この方法により調製した神経の純度は>98%であった。調製した神経 (1.25×10^5 /ウェル, 250 μ l培地/ウェル) は、10nMまたは10 μ Mの sHN ポリペプチド存在下または非存在下で 16 時間ブレインキューベートを行い、同じ濃度の sHNポリペプチドの存在下または非存在下で、25 μ Mの A β 1-43 で 24~72 時間処理を行った。初代培養神経は、培地交換に伴う一過的な乾燥でも傷害を受けるため、A β 1-43 による細胞の処理は次のように行った。まず、古い培地の半量 (125 μ l) を捨てた。そして、50 μ M の A β 1-43 と先に示した濃度の sHN を含む予め温めておいた新鮮な培地 125 μ lを培養に加えた。

トリバンプルー排除アッセイは、次のようにして行った。プレウォッシュなしで細胞を血清不含の培地に穏やかにピペッティングして懸濁した。200 μ lの細胞懸濁液に 50 μ lの 0.4%トリバンプルー溶液 (Sigma, Cat. #T-8154) を加え (終濃度 0.08%)、室温で混合した。トリバンプルー溶液を加えてから3分以内に、染色された細胞を計数した。これを基に細胞死の比率を決定した [100-細胞生存率 (%)]。LDHアッセイは、神経を培養した培地 6 μ lをサンプリングして、キット (LDH-Cytotoxic Test; Wako Pure Chemical Industries, Cat. #299-50601) を用いて行った。カルセイン染色は、以前記載されたようにして行った (Bozyczko-Coyne, D. et al. (1993) Journal of Neuroscience Methods 50, 205-216)。簡単には、6 μ M の Calcein-AM {3',6'-Di-(0-acetyl)-2',7'-bis[N,N-bis

(carboxymethyl)aminomethyl]fluorescein, tetraacetoxymethyl ester; Dojindo, Cat. #349-07201} を神経に添加し、Calcein-AM 処理後 30 分以上経過してから蛍光 (ex=490nm, em=515nm) を蛍光顕微鏡により観察し、スペクトロメーターにより測定した。特異的な蛍光は、全蛍光から基底状態の蛍光を差し引いて計算した。基底状態の蛍光は、トリバンプルー陽性度－蛍光強度の直線関係から算出される、100%トリバンプルー陽性に対応する値とした。

アッセイは少なくとも 3 回、独立してトランスフェクションまたは処理を繰り返して行った。統計解析では Student の t 検定を行った。

ノーザンブロット解析のためのオリゴヌクレオチドの放射標識は、Renaissance 3' end labeling system (NEN) を用いてターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdT) により行った。すなわち、75pmol のプローブオリゴヌクレオチド、100pmol の 3'-[³²P]-dATP (185TBq/mmol, NEN)、および 36 unit の TdT を 37°C で 30 分インキュベートした後、標識されたオリゴヌクレオチドをゲル濾過により分離した。この操作により、 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ cpm/ μ l の標識プローブが得られた。プローブに用いたアンチセンス HN は 5'-CTG CCC GCC TCT TCA CGG GCA GGT CAA TTT CAC TGG TTA AAA GTA AGA GAC AGC TGA ACC CTC GTG GAG CCA TGT GGT G-3' (配列番号: 3) である。cDNA 断片は Ready-To-Go random labeling system (Amasham Pharmacia) により放射標識した。すなわち、50~500ng の変性させた DNA 断片および 1.85MBq [α -³²P]dCTP を 37°C で 30 分インキュベートした後、標識された DNA 断片をゲル濾過により分離した。この操作により、約 5×10^7 cpm/ μ g DNA の標識プローブが得られた。ノーザンブロット解析は ExpressHyb (Clontech) を用いて行った。すなわち、プレハイブリダイゼーションの後、組織のポリ A⁺-RNA がブロットされた膜 (ヒト組織の膜は Clontech より、マウス組織の膜は Origene より入手) を放射標識されたプローブ ($2 \sim 5 \times 10^7$ cpm) に 18 時間浸漬させた。説明書に従って 2 ステップの洗浄を行った後、増感スクリーンを 2 枚使って膜を X 線フィルムに -70°C で露光させた。

【実施例 1】 Humaninの同定

F11細胞は、E17.5のラット初代培養神経とマウス神経芽細胞腫 NTG18 を細胞融合させて樹立された、初代培養神経の不活化細胞モデルである (Platika, D. et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 3499-3503)。分化刺激がなければ、この細胞は活動電位の生成などの初代培養神経に典型的な特徴を保持している (Platika, D. et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 3499-3503)。本発明者は、3種の FAD原因遺伝子である V642I/F/G APP をコードする cDNA を F11細胞にトランスフェクトすることにより、APPの V642 変異体の一過的な発現が細胞死を引き起こすことを見出した (Yamatsuji, T. et al. (1996) Science 272, 1349-1352)。そこで本発明者は、最近開発されたエクダイソン誘導系 (No, D. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 3346-51) を用いて、V642I APPを誘導できるF11クローンの構築を行った。まず、エクダイソン受容体と RXR の両者を過剰発現する F11クローン (F11/EcR) を樹立し、この細胞に、エクダイソン応答配列の制御下に置かれた HSV プロモーターにより発現される V642I APP cDNA をコードする pIND-V642I APP を安定にトランスフェクションすることにより、V642I APPの発現を誘導することができる F11細胞を樹立した。このようにして樹立されたクローン F11/EcR/V642I 細胞は、そのままでは V642I APP をほとんど発現しないが、エクダイソン処理によりコンディショナルに V642I APP を過剰発現することが確かめられた。そしてエクダイソン処理にตอบสนองして、各 F11/EcR/V642I細胞で細胞死が誘導され、全F11/EcR/V642I細胞中の細胞死の比率は処理後 72 時間で 60~70%、処理後 96 時間で80~90%に達した。

これらの細胞を用いて、D'Adamio ら (D'Adamio, L. et al. (1997) Semin. Immunol. 9, 17-23) により開発された方法に基本的に従いながら、それに修正を加えた「デストラップスクリーニング」を行った。最初に記載された「デストラップスクリーニング」においては、Vitoらは正常 T 細胞 cDNAライブラリーを Jurkat細胞にトランスフェクトし、T細胞受容体の刺激により細胞死を誘導し、細

胞死をアンタゴナイズする遺伝子を回収した。本発明者は、デストラップスクリーニングを行い、AD遺伝子により誘導される細胞死をアンタゴナイズする遺伝子のスクリーニングを試みた。まず、F11/EcR/V642I 細胞に哺乳動物発現 cDNA ライブラリー [cDNAはアルツハイマー病患者の脳試料 (後頭の皮質) から調製し、ライブラリーは、エロンゲーションファクタープロモーターを持つ哺乳動物細胞発現ベクター pEF-BOS を用いて構築した] (Mizushima and Nagata, 1990, Nucleic Acids Res. 18: 5322) をトランスフェクトし、この細胞をエクダイソンで 72 時間処理し、生き残った細胞からプラスミドを回収した。この操作を 3 回繰り返し、最終的に約250クローンのプラスミドを得た。各プラスミドを用いたドットプロットハイブリダイゼーションにより、これらのクローンは互いにクロスハイブリダイズする 36 のグループに分類された。最も大きいグループは 28 のクローンからなっていた。

このグループの cDNA に着目し、各クローンのシーケンスを行った結果、このグループに属するクローンは総合すると、5' 配列は Wnt-13 の非コード領域と相同性があり、3' 配列は ミトコンドリア 16S リボソーム RNA と相同性があり、C末端にポリA領域を持つ1535bpの融合配列からなるcDNAをコードしていた。この配列全体は新規なものであった (図1)。各クローンの配列を決定したのち、各クローンの一過的なトランスフェクションが、pIND-V642I APP をコトランスフェクトした F11/EcR 細胞のエクダイソンにより誘導される細胞死を有意に抑制するかについてアッセイを行った。細胞死抑制活性を示した各々の配列を比較した結果、V642I APPにより誘導される細胞死をアンタゴナイズする活性は、新規な24アミノ酸のポリペプチド「MAPRGFSCLLLLTSEIDL PVKRRRA」(配列番号: 5) をコードする 75bp のオープンリーディングフレーム (ORF) (5'-ATGGCTCCACGAGGGTTTCAGCTGTCTCTTACTTTTAACCAAGTGAAATTGACCTGCCCGTGAAGAGGCGGGCATGA-3' / 配列番号: 4) によりコードされていることが判明した。本発明者は、この分子を Humanin (HN) と名付けた。

〔実施例 2〕 FAD遺伝子により誘導される細胞死における各クローンの抑制効果

図 2～4 は、このグループに属する各クローンをコトランスフェクトしたときの効果を示す。F11/EcR 細胞 (EcR と RXR とを安定に発現する F11 クローンで、エクダイソンにより pIND プラスミドによりコードされる遺伝子の発現が誘導される) に V642I APP をコードする pIND を一過的にトランスフェクトしたところ、エクダイソンの非存在下 (V642I APP 非誘導条件) では、72 時間後に約 20% の細胞が細胞死を起こしたのに対し、エクダイソンの存在下 (V642I APP 誘導条件) では、有意に高い割合 (50～60%) の細胞が細胞死を起こした (図 2)。F11/EcR 細胞に、V642I APP をコードする pIND に加え、DT63 をコードする pEF-BOS をトランスフェクトすると、エクダイソン存在下でも、エクダイソンにより誘導される細胞死の有意な増加は観察されなかった。これとは対照的に、pEF-BOS、または DT171 をコードする pEF-BOS を細胞にトランスフェクトした場合には、エクダイソンに応答した細胞死の有意な増加が観察された。図 3 は、単純な一過的トランスフェクションを用いて 4 つの各 FAD 遺伝子 (V642I APP、NL APP、M146L PS-1、および N141I PS-2) により誘導される神経細胞死における DT63 の効果を確認した結果である。各 FAD 遺伝子 (V642I APP、NL APP、M146L PS-1、または N141I PS-2 cDNA) をコードする pcDNA のいずれかに加え、空の pEF-BOS を F11 細胞にコトランスフェクションした場合、72 時間のインキュベーションにより 50～70% の細胞が細胞死を起こした。この条件におけるトランスフェクションの効率は約 60～70% であるため、各 FAD 遺伝子を発現する細胞の大部分が、トランスフェクト後 72 時間で細胞死を起こしたことになる。F11 細胞に、各 FAD 遺伝子に加え、DT63 をコードする pEF-BOS をトランスフェクトした場合、細胞死の増加は劇的に抑えられた。このことは、DT63 cDNA が 4 つの AD 遺伝子により誘導される細胞死すべてを、高い効率でアンタゴナイズすることを示している。図 4 は、HN の全配列を含む他の DT クローンや全配列を含まない他の DT クローン (DT29、DT44、および DT171

cDNA) の効果を示す。HN の全配列をコードするクローンである DT29 および DT44 では、各FAD遺伝子により誘導される細胞死の顕著な抑制が認められたが、HN の第一ATGコドンを持たない DT171 では、細胞死をアンタゴナイズする作用は認められなかった。これらのデータは、HN がコードする ORF が、4つのすべてのFAD 遺伝子による細胞死から神経細胞を保護することを示している。

そこで本発明者は、HN cDNAを pFLAG ベクターへサブクローニング (pHN) し、V642I APP、NL-APP、M146L PS-1、および N141I PS-2の各々のFAD遺伝子による神経細胞死に対する pHN の効果を直接調べた。予想された通り、F11細胞に対する pHN のトランスフェクションは、毒性をほとんど示さないばかりか、各FAD遺伝子による毒性を解消させた (図5)。このアンタゴナイズ活性は、pHN により各FAD 遺伝子の発現が抑制されたことによるものではない。なぜなら、pHN のコトランスフェクションは、CMVプロモーターにより発現する EGFP の発現を変化させなかったことから (データ省略)、コトランスフェクトされた pHN は、同じ CMV プロモーターから発現される各FAD遺伝子の発現を変化させないことが示されたからである。さらに、V642I APP、NL-APP、および N141I PS-2 のイムノブロッティングによっても、各遺伝子の発現に pHN のコトランスフェクションがほとんど影響を与えないことが確認された (データ省略)。

【実施例3】 HN の細胞外分泌

実験の過程で、pHNをトランスフェクトした F11 細胞の培養上清 (CM/F11-pHN) には、V642I APPを含むFAD遺伝子により誘導される細胞死を有意に抑制する活性があることが判明した。新鮮な培地または空のベクターである pFLAGをトランスフェクトしたF11細胞の培養上清 (CM/F11-vec) の存在下で V642I APP cDNAをトランスフェクトした F11細胞では高率で細胞死が誘導されたのに対し、CM/F11-pHN存在下で V642I APP cDNAをトランスフェクトした F11細胞では、細胞死が劇的に減少した (図6)。同じことがDTクローンについても観察された。CM/DT29およびCM/DT63は V642I APP により誘導される F11 細胞の細胞死を完全

に抑制したが、CM/DT171 は抑制しなかった。これは、HN または HN をコードする cDNA から転写される HN ポリペプチドは、培養液中に分泌され、V642I APP による誘導される細胞死を抑制することを示唆している。図 7 は、CM/F11-pHN 中の HN の免疫反応性を抗FLAG抗体で調べた結果を示している。CM/F11-pHN および pHN をトランスフェクトした細胞のライセートには、HN の免疫反応性を示す 3~4 kDa の単一のバンドを含んでおり、FLAG 融合 HN の予想される分子量 (3837Da; 図 7 左 および 中央) に一致していた。合成 FLAG 融合 HN ポリペプチド (MAPRGFSCLLLLTSEIDLVPVKRRAGTDYKDDDDK: 下線は FLAG タグ) (配列番号: 6) を用いて濃度を決定した結果、HN は CM/F11-pHN 中に 8~9 μ M の濃度で含まれていることがわかった (図 7 右)。これらの知見は、HN は pHN から転写され培養上清中に分泌されることを示している。

〔実施例 4〕 HN はシグナル配列様の活性をコードしている

HN 配列の全 24 アミノ酸中の N 末端の 23~24 残基は、シグナル配列の必要条件を満たしている (Nielsen, H. et al., 1999, Protein Eng. 12, 3-9; 決定のためのプログラムは <<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>> から提供されている)。細胞内で発現した HN が μ M の濃度で培養液中に分泌される事実から、シグナル配列活性そのものではないが、シグナル配列に似た活性が HN に含まれていることが示唆される。FLAG タグは C 末端に位置しており、分泌された HN ポリペプチドは FLAG 融合 HN に予想されるサイズと一致する分子量を保持していることから、HN の配列全体がシグナル配列様の分泌活性をコードしていることが示唆される。

これを確認するため、HN 配列のシグナル配列としての性質を計算上失わせる L9R 変異が、HN の分泌に影響するかを調べた。予想通り、L9R HN 変異体 (HNR) (配列番号: 7) はこれをコードする cDNA のトランスフェクションにより細胞の内側で発現したが、培養上清中には分泌されなかった (図 8 上)。この結果は、HN 配列のシグナル配列様の分泌活性は、HN の一次構造に書き込まれていることを証明する。これとは別に、HN 配列を EGFP の N 末端に融合 (HN-EGFP) させ、HN のシグ

ナル配列活性を直接的に調べた。N末端にHNを融合させたEGFPはトランスフェクトされた細胞の培養上清に分泌されたが、もともとのEGFPは細胞外に全く分泌されなかった（図8下）。N末端にHNRを融合させたEGFPは、EGFP同様、全く分泌されなかった。これらのデータから、HNそのものがシグナル配列様活性をコードしていることが実証された。このように、HNはシグナル配列様分泌活性と生物学的活性とを同時にコードしているユニークな分泌蛋白質である。

〔実施例5〕 V642I APPにより誘導される細胞死における合成 HN ポリペプチドの抑制効果

本発明者は次に、合成 HN ポリペプチド MAPRGFSCLLLLTSEIDL^UPKRRA（配列番号：5）を合成し、V642I APP により誘導される神経細胞死において、このポリペプチドを細胞外から加えた場合の作用を調べた。F11細胞に V642I APP cDNA をトランスフェクトし、10 μ M の合成 HN ポリペプチド（sHN）存在下で培養したところ、V642I APP により誘導される細胞死は劇的に抑制された（図9）。10nM sHN では極弱い抑制を示すのみであったが、抑制作用は添加する sHN の濃度に依存しており、1~10 μ M のポリペプチドのレベルで完全な抑制に達した。IC₅₀ 値は約100nM であった。この用量依存曲線は、CM/F11-pHN中に分泌された HN が 約10 μ M のレベルで V642I APP により誘導される細胞死を効果的に抑制した事実と一致している。

〔実施例6〕 V642I APPにより誘導される細胞死における HN ポリペプチドおよびその構造的誘導体の抑制効果

本発明者はさらに、sHN の細胞死抑制作用が特異的な一次構造によるものであるのかを検討した（図9）。ポリペプチドとして S14G（MAPRGFSCLLLLTGEIDL^UPKRRA：下線のGはSから置換されている；HNGと称す）（配列番号：8）を用いると、V642I APP により誘導される細胞死に対し、10nM以下の濃度において完全なアンタゴナイズ効果が認められ、IC₅₀ は約100pMであった。これに対して、C8A HN ポリペプチド（MAPRGFSALLLTSEIDL^UPKRRA：下線のAはCから置換された；HNAと称す）（配

列番号：9) は 100 μ M までの濃度において、V642I APP により誘導される細胞死を有意に抑制することはできなかった。8位の Cys が重要であることは、8位の Cys を介した HN のダイマー (C8-C8 HN) により得られた結果からも示唆された。C8-C8 HN のアンタゴナイズ作用のレベルは、元々の HN と HNA の中間であった。また、対照的に、HN の C 末端の KRRA を AAAA に置換した誘導体 (配列番号：10) は、元々の HN ポリペプチドと同様の作用能を示した。これらの結果は、HN の抑制活性に一次構造が本質的な役割をもつと共に、特定のアミノ酸残基が決まった役割を有していることを示している。

【実施例 7】 FAD 遺伝子により誘導される細胞死における HN ポリペプチドおよびその構造的誘導体の抑制効果

次に、他の FAD 遺伝子、すなわち NL-APP、M146L PS-1、および N141I PS-2 により誘導される細胞死に対する sHN、合成 HNG (sHNG)、および合成 HNA (sHNA) の効果を調べた。図 10 に示したように、元々の sHN は 3 つの FAD 遺伝子のいずれにおいても同様の用量-応答特性を示し、1 μ M の濃度で各 FAD 遺伝子により誘導される神経細胞死を妨げた。sHNA は 100 μ M までの濃度において、いずれの FAD 遺伝子による細胞死もアンタゴナイズしなかった。これに対し、sHNG は 10nM 以下の濃度で、各 FAD 遺伝子による細胞死を抑制する完全な活性を有していた。これは、HN の作用は S14G の置換により 100 から 1000 倍に高められることを示している。V642I APP により誘導される細胞死に対する sHNG の作用 (図 9) を合わせて考えると、sHNG は 10nM 以下の濃度で、4 種の異なるタイプの FAD 遺伝子により誘導される神経細胞死を、完全にアンタゴナイズすることができると結論される。

【実施例 8】 HN およびその構造的誘導体を発現するベクターの導入による細胞死抑制効果

合成ポリペプチドで得られたデータを確認するため、次に HNG または HNA をコードするプラスミド (それぞれ pHNG または pHNA) の細胞死抑制効果を、pHN

と比較して調べた。図 1 1 に示したように、pHNGのコトランスフェクションは、pHNの場合と同様に、4 種すべての FAD 遺伝子により誘導される細胞死を完全に抑制した。これとは対照的に、pHNAのコトランスフェクションでは、HNAポリペプチドは、pHNおよびpHNGの場合と同様に産生され、培地中に分泌されている（図 7）にも関わらず、いずれの FAD 遺伝子により誘導される細胞死も抑制しなかった。各プラスミドから得られたこれらのデータは、先に述べたポリペプチドの解析結果を支持しているのみならず、CM/F11-pHNG（pHNGをトランスフェクトしたF11細胞の培養上清）中の HNG 濃度は 10nM を超えていることを示唆している。これに一致して、イムノブロット解析では、pHNG をトランスフェクトした F11 細胞からの培養上清（CM/F11-pHNG）には HNGポリペプチドが約 10 μ M 含まれていた（図 7 右）。これらのデータは、HNの細胞死抑制活性はその特異的なアミノ酸構造により決定されており、細胞外から添加された HN ポリペプチドによる細胞死抑制作用は、細胞内で発現された HN cDNA によっても再現され得ることを示している。

【実施例 9】 HN の細胞死抑制効果の特異性

HNの作用の特異性を明らかにするため、次に HN cDNA または HN ポリペプチドが、他の神経変性疾患の原因遺伝子により誘導される細胞死をアンタゴナイズすることができるかを調べた。72回の繰り返しを持つポリグルタミン Q79 は、ハンチントン病（HD）や、ある種の脊髄小脳性運動失調症（spinocerebellar ataxia; SCA）の原因になっていると考えられている（Ikeda, H. et al. (1996) Nat. Genet. 13, 196-202; Kakizuka, A. (1997) Curr. Opin. Neurol. 10, 285-90）。Q79の発現が神経細胞の細胞死を引き起こすことが報告されているように、Q79 の発現により F11 細胞は細胞死を起こした（図 1 2）。エクダイソンにより発現が誘導される Q79 プラスミド（pDN-E/G5H-Q79）を F11/EcR 細胞にトランスフェクトし、エクダイソンの存在下または非存在下で神経毒性の試験を行った。この系において、pDN-E/G5H-Q79 を空ベクター（pFLAG）と共に F11/EcR 細胞にトランスフェ

クシオンした場合は、エクダイソン処理に応答して細胞死の比率は顕著に増加した (図 1 2 A)。F11/EcR 細胞に、pDN-E/G5H-Q79 を pHN、pHNG、または pHNA と共にトランスフェクトした場合でも、エクダイソン処理により、同じように高い比率の細胞死が誘導された。これに対し、エクダイソンにより誘導されるいずれのFAD遺伝子の発現により引き起こされる F11/EcR 細胞の細胞死も、pHNのコトランスフェクションにより効果的に抑制された (図 1 2 B)。sHN を用いた実験においても、Q79により誘導される細胞死は抑制されなかった (図 1 2 C)。F11/EcR 細胞に pDN-E/G5H-Q79 をトランスフェクトした場合、4 種のFAD遺伝子による F11/EcR 細胞の細胞死を sHN や sHNG が完全に抑制できる濃度の sHN、sHNG、または sHNA の存在下においても、非存在下における場合と同様、エクダイソンによって大幅な細胞死が引き起こされた (図 1 2 D)。

本発明者はまた、家族性筋萎縮性側索硬化症 (familial amyotrophic lateral sclerosis; 家族性ALS) に関連した Cu/Zn依存性スーパーオキシドディスムターゼ (SOD1) の A4T、G85R、または G93A 変異体により誘導される神経細胞死に対する HN の効果を調べた。家族性ALS関連 SOD1 変異体の発現が哺乳動物神経細胞の細胞死を引き起こすという以前の報告 (Rabizadeh, S. et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92, 3024-8; Ghadge, G. D. et al. (1997) J. Neurosci. 17, 8756-66) と一致して、これらすべての変異体において、それぞれの変異体を発現する cDNA を F11 細胞にトランスフェクトすることにより、有意に細胞死が引き起こされた。そして、各SOD1変異遺伝子に加え、pHNを F11 細胞にコトランスフェクトした場合でも、同様の高い細胞死が誘導された (図 1 3 A)。図 1 3 B に示したように、100 μ M のsHN、sHNG、または sHNA のいずれによっても、各家族性ALS関連 SOD1 変異体による細胞死の抑制は認められなかった。これらのデータは、HN は FAD 遺伝子により触発される細胞死実行機構を抑制する細胞内機構を活性化するが、他の神経変性疾患遺伝子による細胞死には機能しないことを示唆しており、HN cDNA および HN ポリペプチドのアンタゴナイズ効果は、ADに関

連する神経細胞死に共通かつ特異的であることを証拠付ける。

〔実施例 10〕 初代神経培養の細胞死における HN の抑制効果

本発明者は、HN による、初代培養神経のADに関連する傷害からの保護について調べた。 $A\beta$ は老人斑の主要なペプチド成分で、AD脳を病理学的に特徴付ける細胞外沈着物であり、ADの病理機構に関与していると言われている (Selkoe, D. J. (1994) J. Neuropathol. Exp. Neurol. 53, 438-47; Cummings, J. L. et al. (1998) Neurology 51, S2-17; discussion S65-67)。 $A\beta$ 処理は初代培養神経の細胞死を引き起こすことが報告されている (Loo, D. T. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 7951-7955; Gschwind, M. and Huber, G. (1995) J. Neurochem. 65, 292-300)。図 1 4 に示すように、初代培養皮質神経を $25\mu\text{M}$ の $A\beta 1-43$ で 48 ~ 72 時間処理すると、N2 サプリメントの存在下または非存在下にて、軸索の異栄養変化 (dystrophic neuritic changes) を伴う広範な細胞死が引き起こされた。初代培養神経を $10\mu\text{M}$ の sHN で前処理すると、 $A\beta$ で誘導される細胞死と共に軸索の異栄養変化が劇的に抑制された。 $A\beta 1-43$ 処理により、トリパンブルー排除で測定した細胞死 (図 1 5 左パネル) と、細胞から放出された LDH により測定した細胞傷害 (図 1 6) が観察されたが、 $10\mu\text{M}$ の sHN 処理により、細胞の生存を示すこれらの指標はベーサルな状態で観察されたレベルに完全に回復した。同じ条件で、 100ng/ml の NGF は、 $A\beta$ により誘導される神経細胞の生存および LDH 放出の増加をアンタゴナイズする効果はなかった (データ省略)。 $A\beta$ により誘導される神経細胞死のアンタゴナイズに sHN が劇的な効果をあげたのに対して、 $10\mu\text{M}$ sHN で神経を同様に処理しても、初代培養神経に対する $20\mu\text{M}$ のエトポサイド (etoposide) の毒性を防ぐことはできなかった (図 1 5 右パネルおよび図 1 6)。エトポサイドは抗癌剤であり、初代培養神経の細胞死を引き起こすことが報告されている (Nakajima, M. et al. (1994) Brain Res. 641, 350-2)。これらの知見は、HN は $A\beta 1-43$ により誘導される神経細胞死を、選択的な機構でアンタゴナイズするという考えを支持する。F11 細胞を用いた FAD 遺伝子の実験で指摘した

のと同様に、10nM sHNG は、 $A\beta$ 1-43による細胞死および軸索の異栄養変化から神経を完全に保護したが、10nM sHN または 10 μ M sHNAは、いずれも $A\beta$ の神経毒性に対し効果を示さなかった(図14)。これらのデータは、細胞傷害のアッセイであるLDH放出アッセイ(図16)およびトリパンブルー排除アッセイ(図15)により確かめられたのみならず、生細胞のアッセイであるカルセイン(Calcein)染色アッセイ(図17および18)によっても確かめられた。このように、HNは初代培養神経においても、クローン化された神経細胞における場合と同様に効果を有していることが示された。さらに、これらのデータから、HNの構造を特異的に認識する受容体(群)が、F11細胞と初代培養神経に共通して存在していると考えられることができる。

[実施例11] HN mRNA の発現

β -actin mRNAをポジティブコントロールとして、様々な組織におけるHN mRNAの発現を調べた。ヒト組織のノーザンブロット解析により、HN mRNAは心臓、骨格筋、腎臓、および肝臓において顕著に発現していることが判明した(図19a)。それより少ないが、依然として有意な発現が脳および消化管(gastrointestinal tract)に認められた。胸腺、脾臓、および末梢血白血球を含む免疫系にはほとんどmRNAは検出されなかった。発現している主要なmRNAのサイズは約1.6kbであり、これは、HNを含む最も長いDT cDNAの予想されるサイズに相当する。約3kbおよび約1kbのサイズの異なるmRNAも存在した。HNの3'領域をコードし、HNをコードしていないDT77(図1参照)をプローブにした場合も、またHNの-440から-422の5'領域に対するアンチセンスプライマー(GGGTGTGAGCTTGAACGC/配列番号:11)をプローブとした場合も、上記と同様の結果が得られ、これら全てのバンドが検出されたことから、これらのmRNAは全長HN mRNAとそのスプライシングバリエーションであると予想される。ヒト心臓cDNAライブラリーから、本発明者はDT44の位置と事実上同一であり、1kbpを超えるcDNAを幾つか単離した。マウス組織においても、以下の点を除き類似した結果を得た(図20)。第一点はマウスの骨格筋および

肝臓はヒト組織に比べHN mRNA量が少なかったことである。しかしながら、他のマウスの骨格筋および肝臓のHN mRNAは多かった（データ省略）ことから、量的な差異は個体の条件が影響することが考えられる。第二点は、マウス心臓および腎臓において、1kbの小さなmRNAが、1.6kbのものと同等かそれ以上発現していることである。マウス脳、心臓、および骨格筋では特異的に、約0.4kbのmRNAがさらに発現していた。脳の発現領域を詳しく解析した結果、脳の各領域の中では、小脳および後頭葉で比較的多量のmRNAが発現していた。これらの結果は、HN mRNAは主に中枢神経系以外の器官で産生されていることを示している。このことからして、HNは血流に分泌され脳神経に運ばれている可能性が考えられる。または、脳内で局所的に合成されるHNが保護作用を発揮する可能性も想定される。これに関しては、AD脳で神経細胞死に対し最も抵抗力を示す領域である小脳および後頭葉で HN mRNA が最も合成されていることは興味深い。

〔実施例 12〕 HNの分泌欠損変異体の効果

これまでのデータから、細胞外から加えたHNポリペプチドが細胞の外側から作用することは明白であるが、細胞表面から取りこまれたHNポリペプチドが細胞内部で効果を発揮している可能性は否定できない。初代培養神経のA β 1-40による細胞死が、小胞体（ER）に存在する主要なカスパーゼである caspase-12 により媒介されるという報告（Nakagawa, T. et al. (2000) Nature 403, 98-103）があるように、HNがER内で作用している可能性も考えられる。もしそうであるなら、ERで合成されたHNは *in situ* で防御シグナルを生成できることになる。そこで、分泌欠損型変異 L9R HN を用いてこれを検証した。

F11細胞に V621I APP cDNA と L9R HN (HNR) cDNA をトランスフェクトした細胞は、V621I APP cDNA を単独でトランスフェクトした細胞と同様の強い細胞死が観察された（表 1 右レーン）。V621I APP cDNA と HNR cDNA をトランスフェクトした細胞の細胞死は、培養液にsHNが存在すると完全に抑制されることから、細胞内で発現されたHNRに防御活性がないことがさらに確認された。これとは対照的に

、細胞外からsHNRを添加すると、V642I APP cDNAを同じ条件でトランスフェクトしても細胞死が誘導されないことが判明した（表1左レーン）。HNR cDNAからERで翻訳されたHNRは培養液中には分泌されない（図8上パネル）ので、HNが持つ細胞をレスキューする機能には、HNポリペプチドが細胞内ではなく細胞外に存在する必要があることになる。これらのデータは、HNは細胞の外側から作用することによってのみその効果を発揮できることを示している。

表1

transfectionなし	13.2±0.7	pcDNA + pFLAG	10.3±2.0
pcDNA	11.5±0.6	V642I APP + pFLAG	52.2±1.5*
V642I APP	53.7±2.3	V642I APP + pHN	17.6±2.2
V642I APP + sHN	14.4±1.2*	V642I APP + pHNA	53.2±0.6
V642I APP + sHNA	52.5±3.0	V642I APP + pHNR	52.0±2.1**
V642I APP + sHNR	17.7±2.2*	V642I APP + pHNR + sHN	15.3±2.0*

（F11細胞にpcDNAまたはV642I APP cDNAをトランスフェクトする時に、pFLAGまたはpHNプラスミド（右）を同時にコトランスフェクトするか、または10 μ M sHNポリペプチド（左）で処理した。72時間培養後、トリバンプルー排除アッセイにより細胞死（%）を測定した。値は3回の独立したトランスフェクションおよび処理の平均±S.D.を示す。*：V642I APPによる細胞死に対して有意な抑制（ $p<0.01$ ）、**：V642I APPによる細胞死に対して有意な抑制なし）

【実施例13】 HNの防御活性における詳細な構造／機能関係

HNの一次構造と防御活性との詳細な関係性を調べた。図21は欠失したHNポリペプチドがV642I APPをアンタゴナイズするかを解析した結果を示している。F11細胞にV642I APP cDNAをトランスフェクトし、10 μ MのHN誘導体の存在下で培養した。この系において、HNポリペプチドのN末端から2残基を欠失させても、細胞

保護活性にはほとんど影響がなかった。これに対し、N末端から3残基を欠失させるとHNの活性は消失した。このことは、N末側の最末端の Met-Ala はなくてもよいが、3番目の Pro は活性に本質的であることを示唆する。同様のC末端側の欠失実験により、図21に示すように、HNの完全な保護活性を維持するためには、C末側最末端の Val-Lys-Arg-Arg-Ala はなくてもよいが、19番目の Pro は活性に本質的であることが判明した。従って、最大の活性のために必要な最少の領域は Pro3-Pro19 であり、これを HN-17 (配列番号：21) と名付けた。

図22の左上パネルは、4つのFAD遺伝子による神経細胞死に対する、N末端の3残基を欠失したHN(Δ N3)およびHN-17の効果を示している。HN-17は、上記の V642I APP 以外の3つのFAD遺伝子による細胞死に対しても、十分にアンタゴナイズする活性を示すのに対し、 Δ N3ペプチドはいずれの遺伝子に対しても活性を示さなかった。図22の他のパネルは、4つのFAD遺伝子の各々による神経細胞死における合成HN-17の効果の用量応答関係を示す。M146L PS-1 による細胞死の抑制に対しては、もともとのHNに比べHN-17は僅かに活性が低下しより高い濃度を必要としたものの、低 μ MのHN-17は4つのFAD遺伝子による細胞死全てに対し共通して、十分な保護作用を発揮した。この結果は、N末端の2残基およびC末端の5残基は、この共通した保護作用には必要ではないことを示唆している。

HN-17の保護作用にその残基が本質的であるのかをさらに検証した。まず、S14GのHN-17 (HNG-17) (配列番号：24) 10nM が、10nMのHNGを用いた場合と同様、4つのFAD遺伝子によるF11細胞の細胞死、および $A\beta$ 1-43による初代培養神経の細胞死を完全にアンタゴナイズできることが確認された。次に、HNG-17の Pro3から Pro19 までの各残基を1つずつAlaに置換したHNG-17誘導体 (配列番号：25～41) を合成し、25 μ M $A\beta$ 1-43による初代培養神経の細胞死における効果を調べた。図23は、Alaに置換した各HNG-17誘導体の細胞死抑制効果の試験結果である。細胞死の値を示すグラフの下に置換残基を示した。この試験の結果、 $A\beta$ により誘導される細胞死からの神経保護に本質的な以下の7残基が明確に同定された：3

番目のPro、8番目のCys、9番目のLeu、12番目のLeu、13番目のThr、14番目のGly（もともとはSer）、および19番目のPro。この試験は、他の残基の役割を否定するものではないが、それらの残基は防御活性に影響を与えることなくAlaに置換することが可能であった。3番目のPro、8番目のCys、14番目のGly、および19番目のProが不可欠であることは、HN欠失実験（図21）および前述のHNのアミノ酸残基置換実験（図9および10）で得られたデータとも一致している。14番目のSerをAlaに置換すると防御活性が失われるにも関わらず、Glyに置換すると防御活性が高まることは注目に値する。このことから、特定の残基および側鎖の軽度の変化が、A β 1-43に対するHNの防御活性を上昇させたり下降させたりすることが示された。

図23の他のパネルは4つのFAD遺伝子の各々によるF11神経細胞の細胞死に対するHNG-17のAla置換体（Ala-scanned HNG-17）の効果を調べた結果を示している。このデータから、アンタゴニズムに本質的役割を果たす残基は、A β により誘導される初代培養神経に対するアンタゴニズムにおいて得られた結果と全く同一であることが明らかとなった。これは、HNが、ADの傷害の幅広いスペクトラムにおいて、共通の機構を介して神経細胞を保護することを示唆している。これら7つの本質的な残基は、細胞表面の特定の機構（受容体等）に認識されるのに必要なある種の2次構造を維持している可能性がある。

HNおよびHNGの活性の高い能力と共に、その活性が一次構造に厳格に依存している事実は、特異的受容体の存在を示唆している。これを支持するように、4つのFAD遺伝子およびA β 1-43により引き起こされる神経細胞死に対するHNのアンタゴニズムは、上記のように互いに非常に類似した用量応答特性を示した。このことは、ポジティブ（S14G）およびネガティブ（C8A）な機能を持つHN誘導体のいずれにも当てはまる。詳細な構造／機能関係の解析により、これら様々なAD傷害に対するアンタゴニズムに必須なHNの領域および残基は正確に一致することが実証された。さらに、分泌能欠損型の変異体の実験により、HNが細胞外に分泌されることが、防御活性の発揮に必須であることが明らかとなった。これらのデータは、

HNの作用が細胞の外側から特異的な細胞表面受容体介していることを示している。

【実施例 14】 HNGのC8置換体の作製

HNペプチドは第8残基にシステイン (Cys) を持ち、上記の通り、このCysをアラニン (Ala) に置換すると活性を失った。また、HNペプチドにおいて、8位のCysにおけるSH基を失った sHN のダイマー型 (C8-C8) では細胞死のアンタゴナイズ活性が低下した。このことは、HNペプチドの8位に対応するCys残基のSH基の修飾は、細胞死のアンタゴナイズ活性に影響を与えることを示唆している。血中や人体組織中には、Cys残基のSH基を修飾し得る酵素が多数存在していることから、ポリペプチドを臨床応用するためには、Cys残基を含まないポリペプチドか、またはCys残基のSH基の修飾がポリペプチドの活性に影響を与えないものであることが好ましい。そこで、ポリペプチドHNGの8位のCysを他のアミノ酸に置換した変異ポリペプチドを作製し、これらのポリペプチドの細胞死アンタゴナイズ活性を測定した。

F11細胞をそのまま、またはF11細胞にV642I-APP cDNA (1 μ g) をトランスフェクトし、8位のCys (C8) を他の可能な19アミノ酸残基のうちの1つに置換したHNG変異ポリペプチド (10nM) のいずれかで処理した。トランスフェクション開始の72時間後にトリバンプルー排除アッセイにより細胞死の比率を測定した。その結果、C8をHis (配列番号: 46)、Lys (配列番号: 48)、またはArg (配列番号: 54) といった塩基性アミノ酸に置換した場合に、有意な神経細胞死抑制活性を示すことが判明した (図24上パネル)。

次に、V642I-APP cDNA以外の他のFAD遺伝子による細胞死誘導に対するアンタゴナイズ活性を調べた。F11細胞をそのまま、または 1 μ gのFAD遺伝子 (K595N/M596L-APP、M146L-PS-1、または N141I-PS-2 cDNA) をトランスフェクトし、C8を他のアミノ酸に置換したHNG変異ポリペプチド (10nM) のいずれかで処理した。トランスフェクション開始の72時間後にトリバンプルー排除アッセイにより

細胞死の比率を測定した。その結果、やはりC8をHis、Lys、またはArgといった塩基性アミノ酸に置換したHNG変異ポリペプチドはF11細胞の神経細胞死を阻害する活性を示し、その特性はV642I-APP cDNAのトランスフェクションで見られたものと同様であった（図24中央パネル）。

さらに、初代培養皮質神経のA β による細胞死に対する効果も検証した。初代培養皮質神経を、C8を他のアミノ酸残基に置換したいずれかのHNG変異ポリペプチド（10nM）の存在下、25 μ MのA β 1-43で処理した。A β 処理開始の72時間後にトリバンプルー排除アッセイにより細胞死の比率を測定し、カルセイン染色による生細胞のアッセイを行った。その結果、C8のHis、Lys、またはArg置換体は、上記と同様に初代培養皮質神経のA β による細胞死を抑制する活性を示した（図24下パネル）。いずれの細胞死に対しても、C8をLysまたはArgに置換したHNG変異ポリペプチドは、もともとのHNGポリペプチドと同等の強い神経細胞死抑制活性を示し、C8のHis置換体では、細胞死抑制活性の僅かな低下が見られた。これらの結果は、本発明のポリペプチドのCys残基はSH基を持たない他のアミノ酸に置換可能であり、His、Lys、またはArg等の塩基性アミノ酸への置換、特にLysまたはArgへの置換が有用であることが明らかとなった。

【実施例15】 HNG誘導体の作製

HNG（S14G HN）の変異により、その作用をさらに高めることができるかを検証した。HNGの複数のアミノ酸残基を他のアミノ酸に置換して、その神経防御作用を調べた結果、HNGに対して2箇所を変異 R4A/F6A（配列番号：60）させると、HNGよりもさらに高いレスキュー活性を示すことを見出した。AGA-HNGと名付けられたこのポリペプチドは、FAD遺伝子による株化神経細胞の細胞死を僅か0.1nMの濃度で完全にレスキューするのみならず、初代培養神経のA β による細胞死を0.3nMの濃度で完全にレスキューした（図25）。HNGの4番目のArgおよび6番目のPheは、それぞれトリプシン様プロテアーゼおよびキモトリプシン用プロテアーゼにより切断され得る部位（図25A参照）であるため、R4A/F6Aの置換によりHNG

は分解に対してより抵抗性となる可能性が高い。AGA-HNGは、その濃度よりも約100000倍もの高濃度のA β の神経毒性を解消させるという事実は、AGA-HNGがこれまでにない高い作用を持つことを意味している。このように広いスペクトラムを持ち、高い神経保護作用を示す抗AD剤はこれまで全く報告されていない。AGA-HNGまたはその誘導体は、ADの化学療法への応用が期待される。

産業上の利用の可能性

本発明によって、アルツハイマーに関連する神経変性をアンタゴナイズする能力を有するポリペプチド Humanin が提供された。該ポリペプチドは、4種のFAD遺伝子およびA β により誘導される神経細胞の細胞死をアンタゴナイズする能力を有する初めての分子であり、クローン化された神経細胞において、V642I APP、NL-APP、PS-1変異体、およびPS-2変異体による細胞死を、そして初代培養神経において A β 1-43 による細胞死をアンタゴナイズできる。細胞外に作用し、既知のすべてのタイプの早発型FAD遺伝子およびA β をアンタゴナイズするという広いスペクトラムを持つ防御因子はこれまで全く同定されていない。特に、HNG が10nM 足らずでADに関連する神経毒性を完全にアンタゴナイズするということは、アルツハイマーに関連する神経細胞死の機構解明に有用であると同時に、臨床応用の観点からも極めて有用である。HNGは防御作用の極めて高い作用能、汎用性、および厳格な特異性を有しており、HNG、AGA-HNG、およびそれらから生み出される誘導体は、アルツハイマー病に関連する神経細胞死を予防する医薬として、また新たなアルツハイマー病治療薬開発のためのリード化合物として極めて有用である。

請求の範囲

1. 式 (I)

Pro-Xn₁-(Cys/bXaa)-(Leu/Arg)-Xn₂-Leu-Thr-(Gly/Ser)-Xn₃-Pro (I)

(式中、「Cys/bXaa」はCysまたは塩基性アミノ酸、「(Leu/Arg)」はLeuまたはArg、「(Gly/Ser)」はGlyまたはSerであり、Xn₁、Xn₂、およびXn₃はそれぞれ独立に10残基以下の任意のアミノ酸を表す)

からなるアミノ酸配列を含み、アルツハイマー病に関連する神経細胞死を抑制する活性を有するポリペプチド。

2. 下記 (a) または (b) に記載のポリペプチド。

(a) 配列番号：5～8、10、12、13、21～24、26～29、32、33、37～40、46、48、54、および60からなる群より選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) 配列番号：5～8、10、12、13、21～24、26～29、32、33、37～40、46、48、54、および60からなる群より選択されるアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を含み、アルツハイマー病に関連する神経細胞死を抑制する活性を有するポリペプチド。

3. 神経細胞死の抑制のために用いる、請求項1または2に記載のポリペプチド。

4. 請求項1から3のいずれかに記載のポリペプチドと他のポリペプチドとの融合ポリペプチド。

5. 請求項1から4のいずれかに記載のポリペプチドをコードするDNA。

6. 請求項5に記載のDNAが挿入されたベクター。

7. 請求項6に記載のベクターを保持する宿主細胞。

8. 請求項7に記載の宿主細胞を培養し、発現させたポリペプチドを該宿主細胞

またはその培養上清から回収する工程を含む、請求項 1 から 4 のいずれかに記載のポリペプチドの製造方法。

9. 請求項 1 から 4 のいずれかに記載のポリペプチドを神経細胞に接触させる工程を含む、神経細胞死を抑制する方法。

10. 請求項 1 から 4 のいずれかに記載のポリペプチドによる細胞死の抑制活性を検出する方法であって、

(a) 請求項 1 から 4 のいずれかに記載のポリペプチドの存在下で細胞死を誘導する工程、

(b) 細胞死を検出する工程、を含む方法。

11. 請求項 1 から 4 のいずれかに記載のポリペプチドによる神経細胞死の抑制に対する化合物の効果を検出する方法であって、

(a) 被検化合物および請求項 1 から 4 のいずれかに記載のポリペプチドの存在下で神経細胞死を誘導する工程、

(b) 神経細胞死を検出する工程、を含む方法。

12. 請求項 1 から 4 のいずれかに記載のポリペプチドによる神経細胞死の抑制を調節する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検試料および請求項 1 から 4 のいずれかに記載のポリペプチドの存在下で神経細胞死を誘導する工程、

(b) 神経細胞死を検出する工程、

(c) 神経細胞死を促進または抑制する化合物を選択する工程、を含む方法。

13. 請求項 1 から 4 のいずれかに記載のポリペプチドまたは請求項 6 に記載のペクターを有効成分とする医薬組成物。

14. 神経細胞死抑制剤である、請求項 13 に記載の医薬組成物。

15. 神経変性を伴う疾病の予防または治療に用いられる、請求項 13 に記載の医薬組成物。

16. アルツハイマー病の予防または治療に用いられる、請求項 13 に記載の医

薬組成物。

17. 請求項1から3のいずれかに記載のポリペプチドに結合する抗体。

18. 配列番号：4に記載の塩基配列からなるDNAまたはその相補鎖に相補的な少なくとも15ヌクレオチドを含む、請求項1から4のいずれかに記載のポリペプチドをコードするDNAの検出または操作に用いられるDNA。

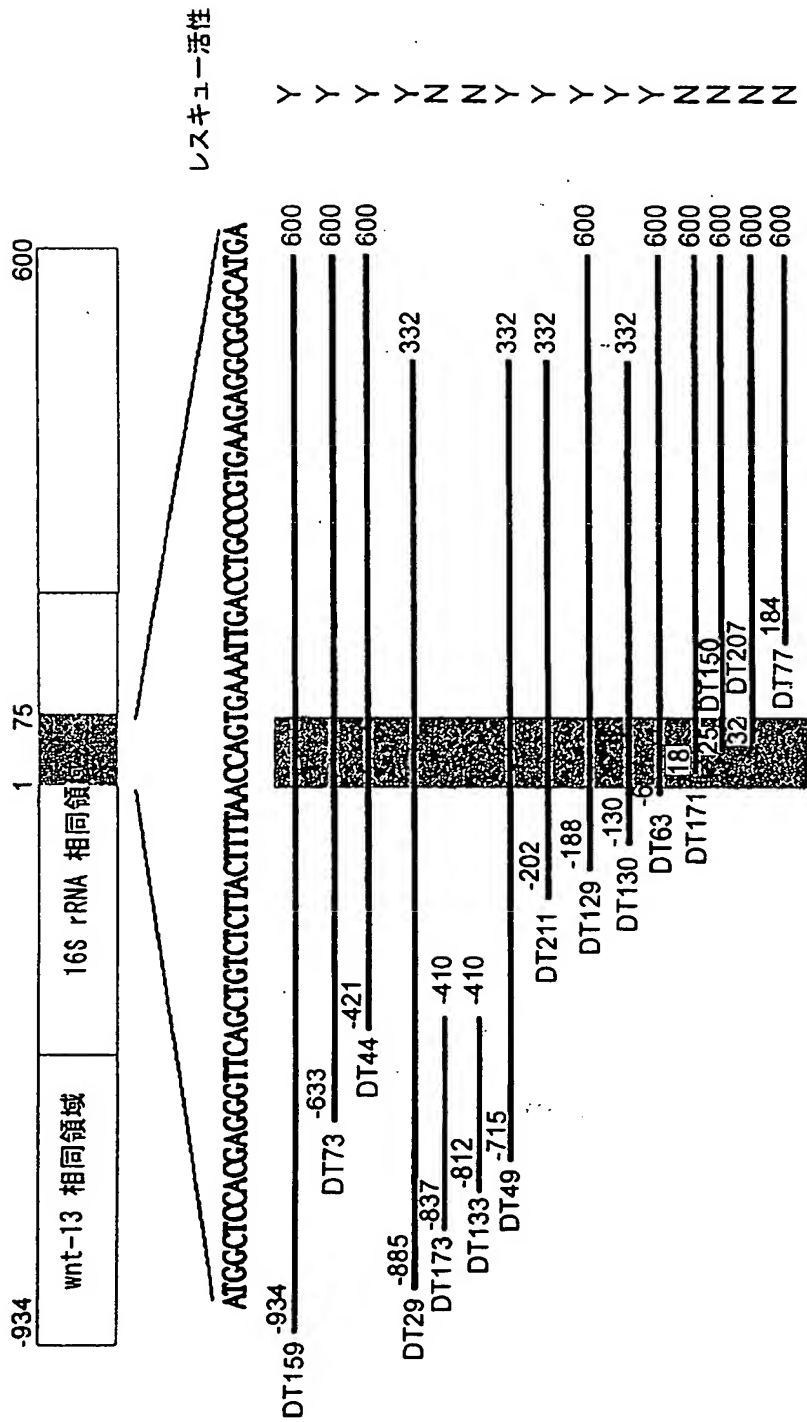
19. 請求項1から4のいずれかに記載のポリペプチドに結合する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 該ポリペプチドに被検試料を接触させる工程、

(b) 該ポリペプチドと被検試料との結合活性を検出する工程、

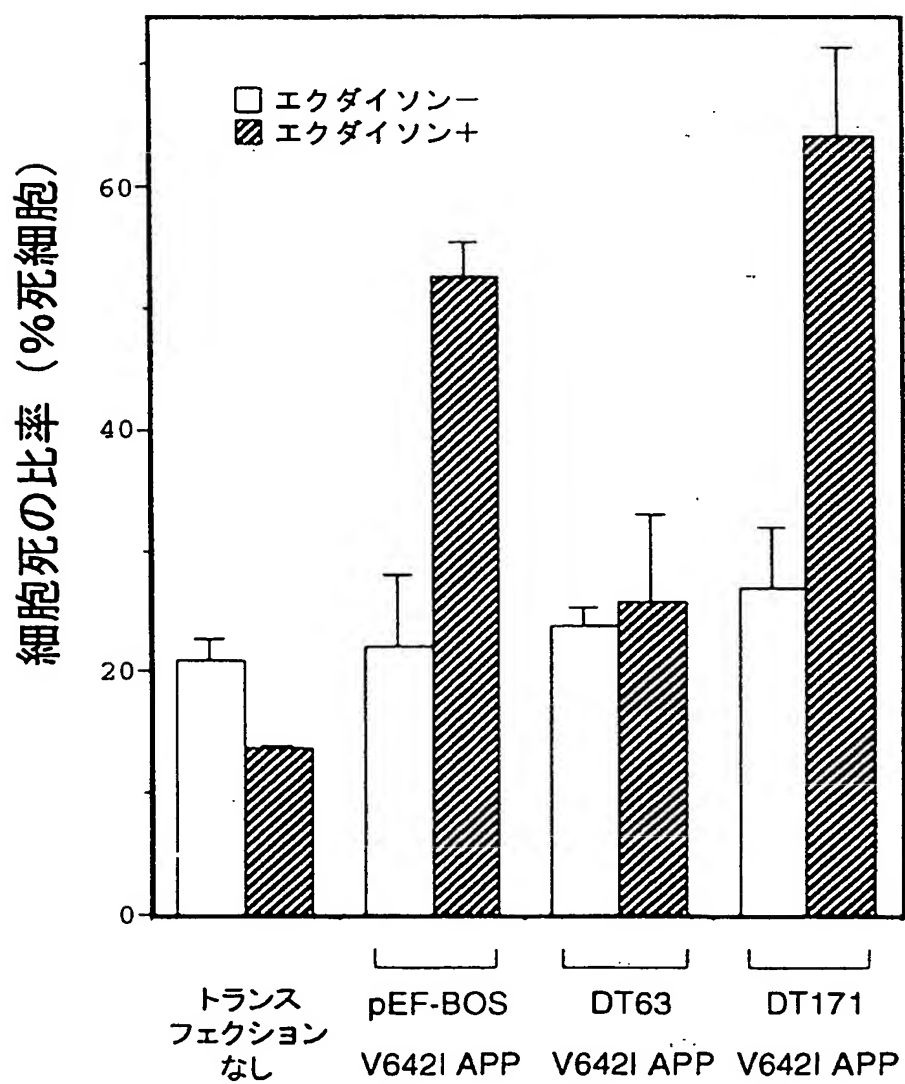
(c) 該ポリペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法。

図 1



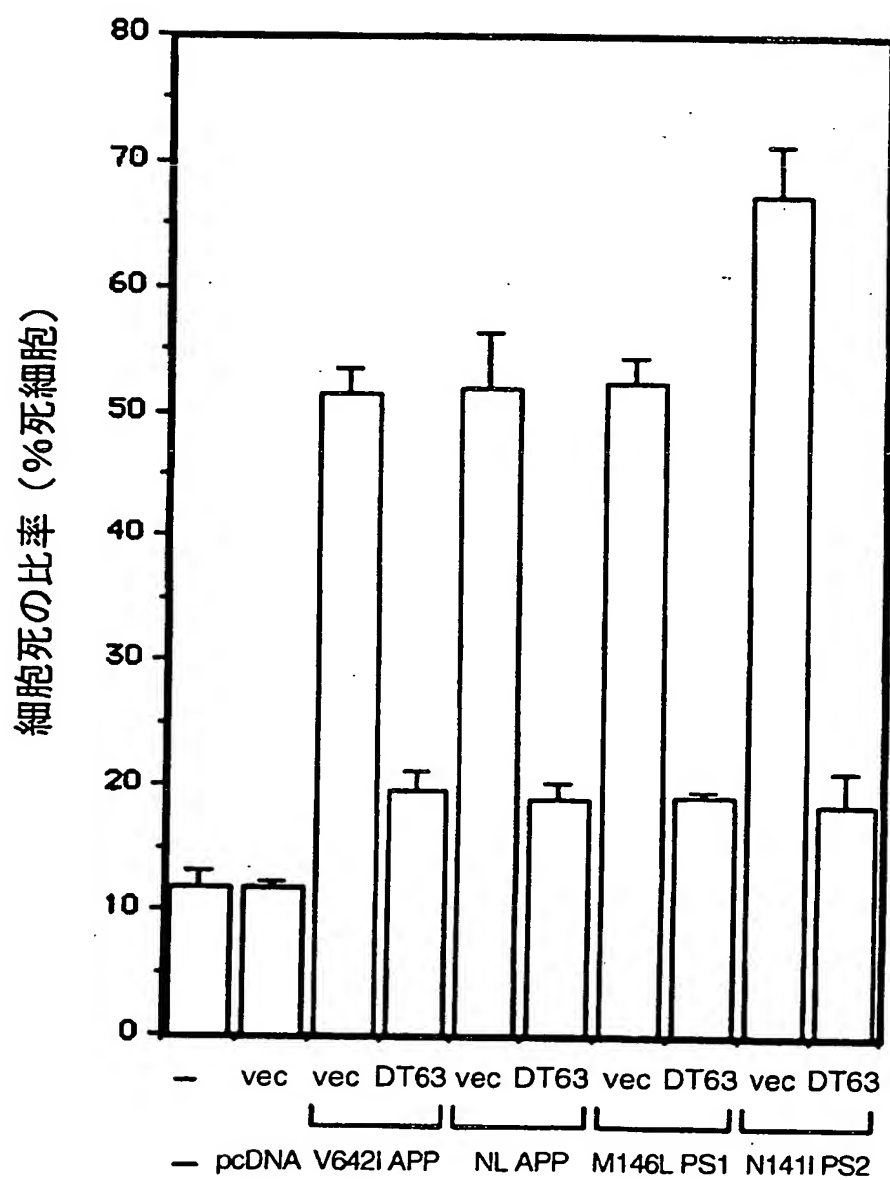
2 / 25

図 2



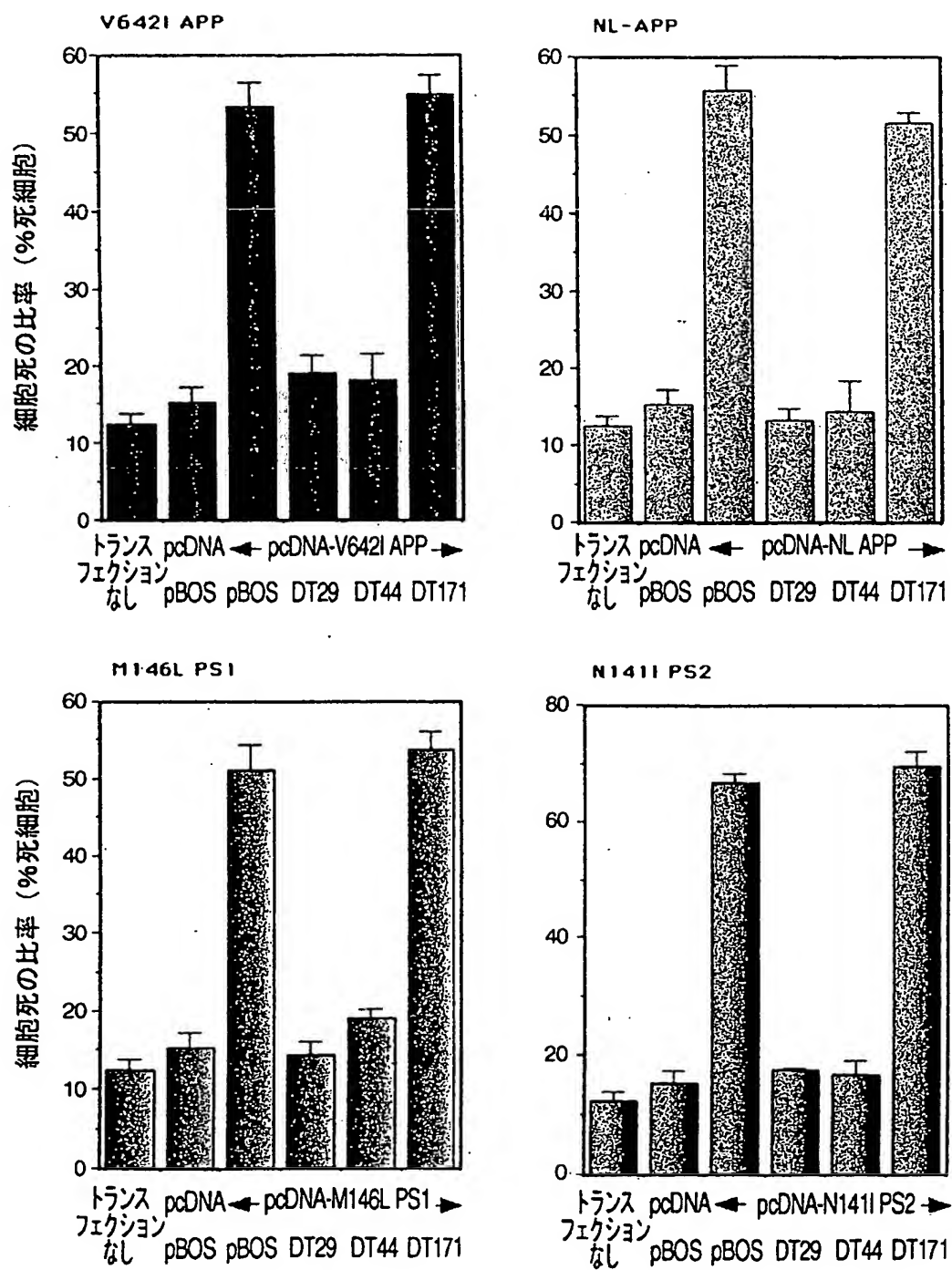
3 / 25

図 3



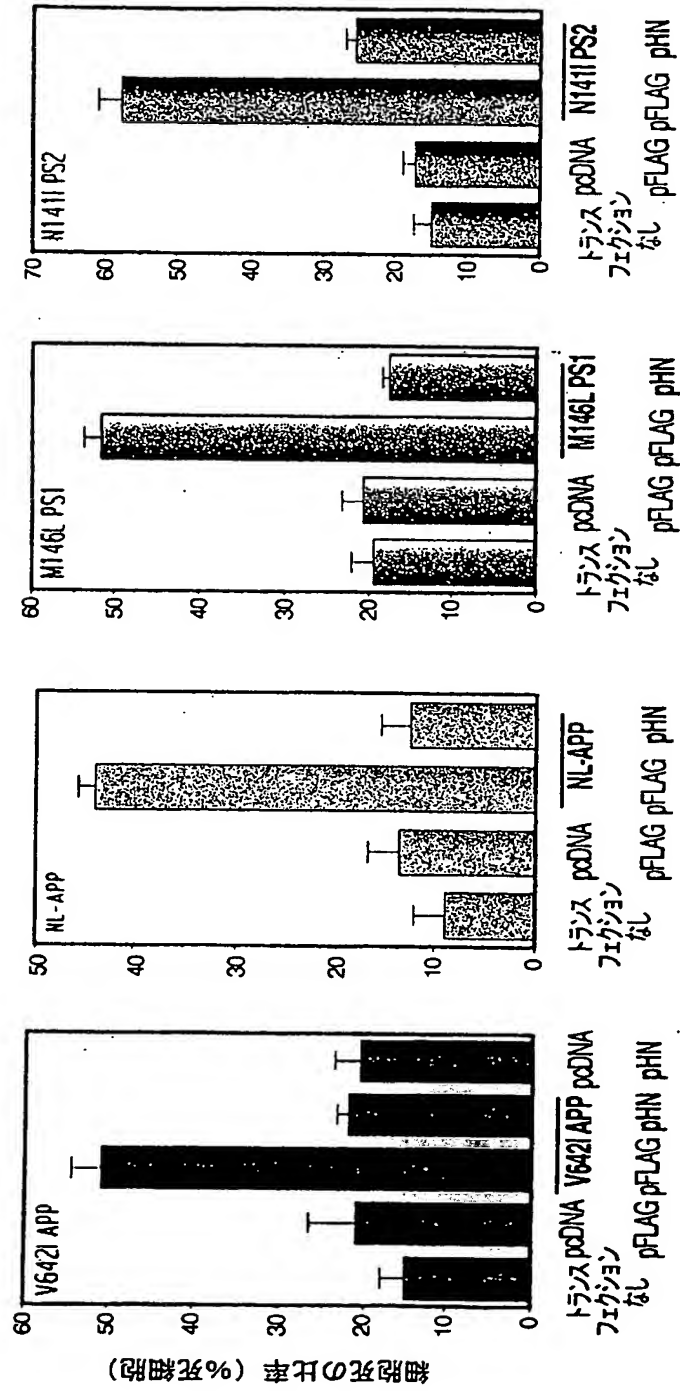
4 / 25

図 4



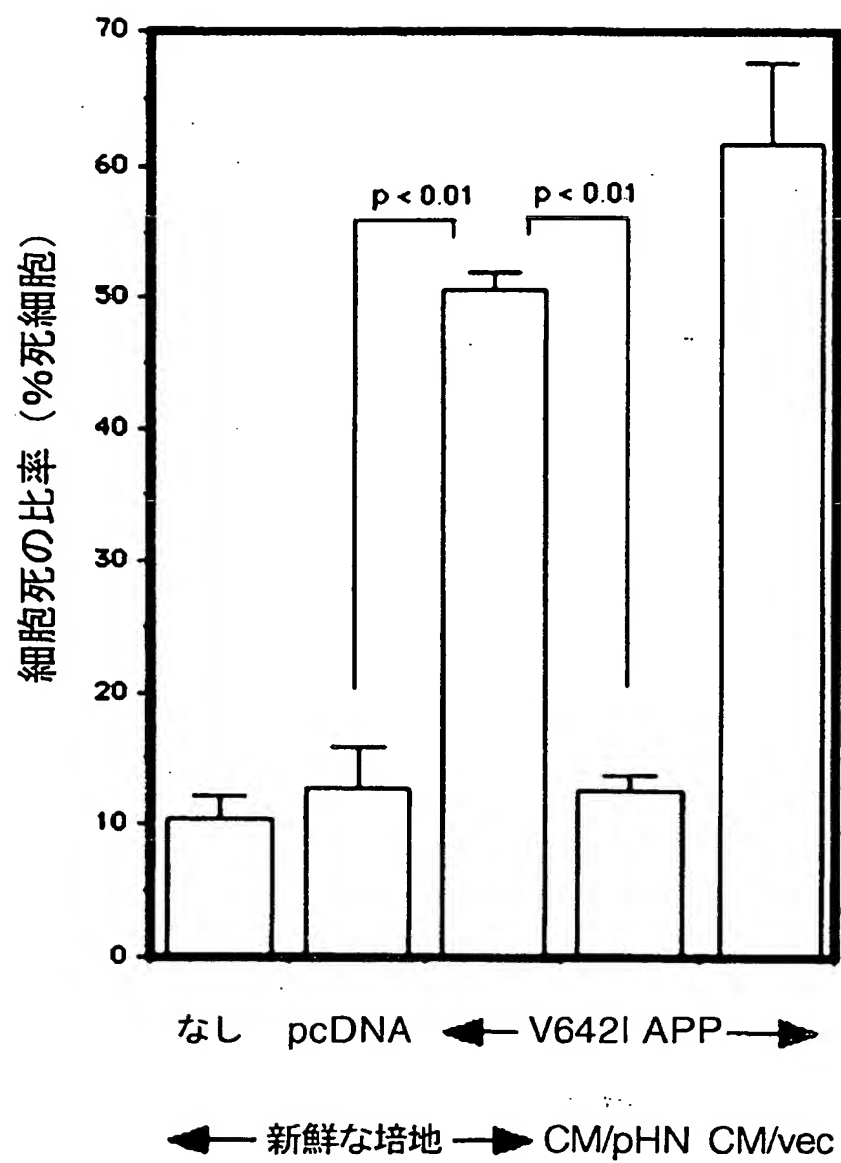
5 / 25

図 5



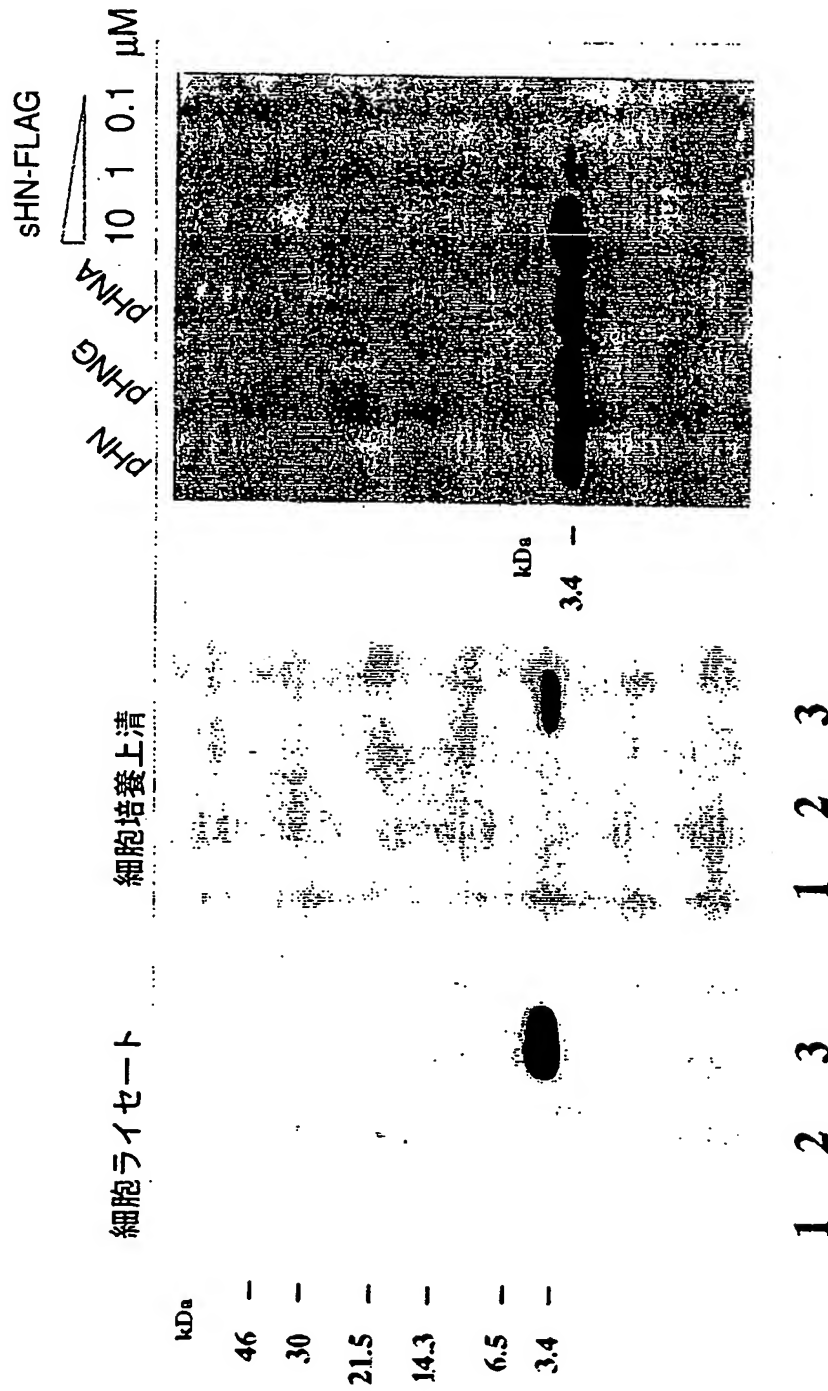
6 / 25

図 6



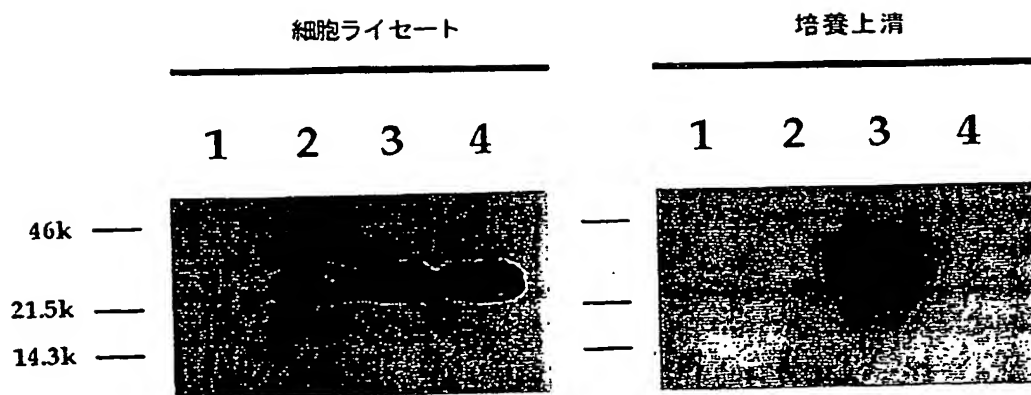
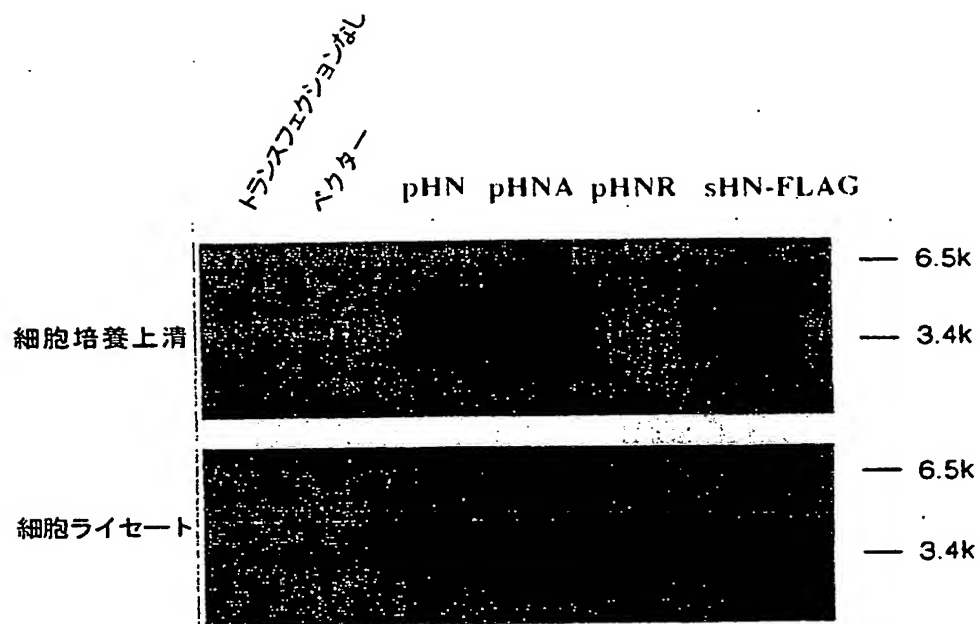
7/25

図 7



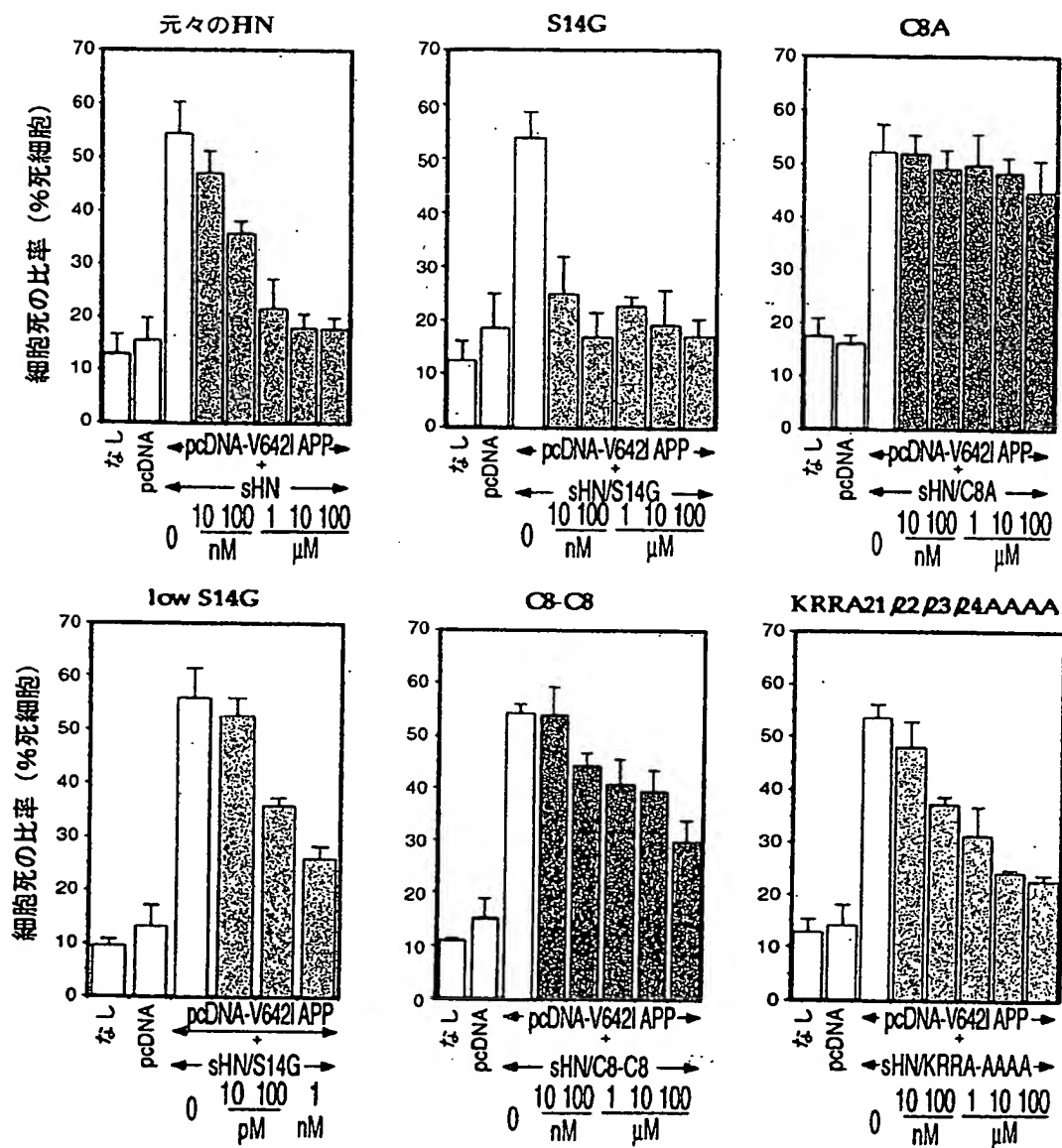
8 / 25

図 8



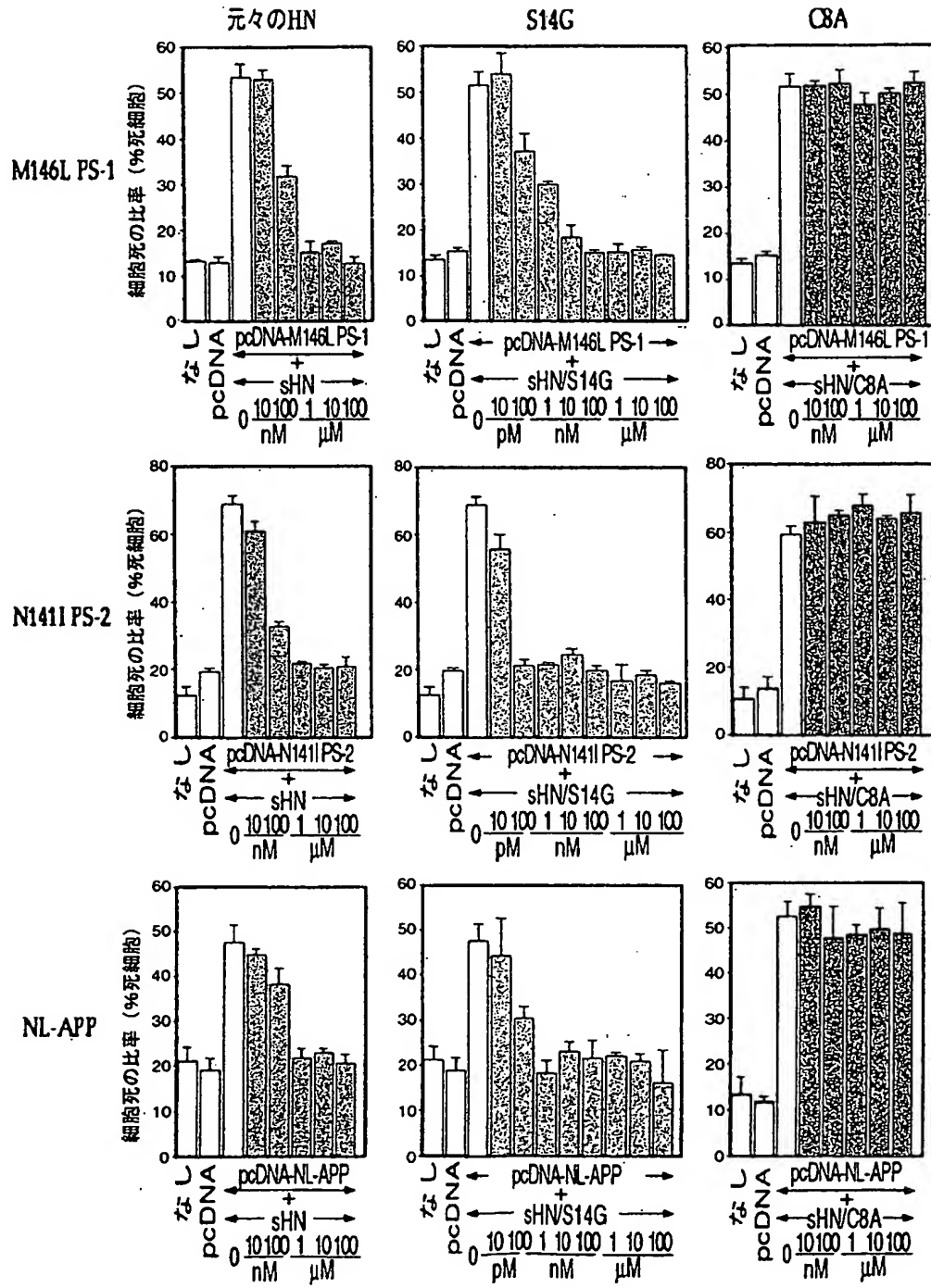
9 / 25

図 9



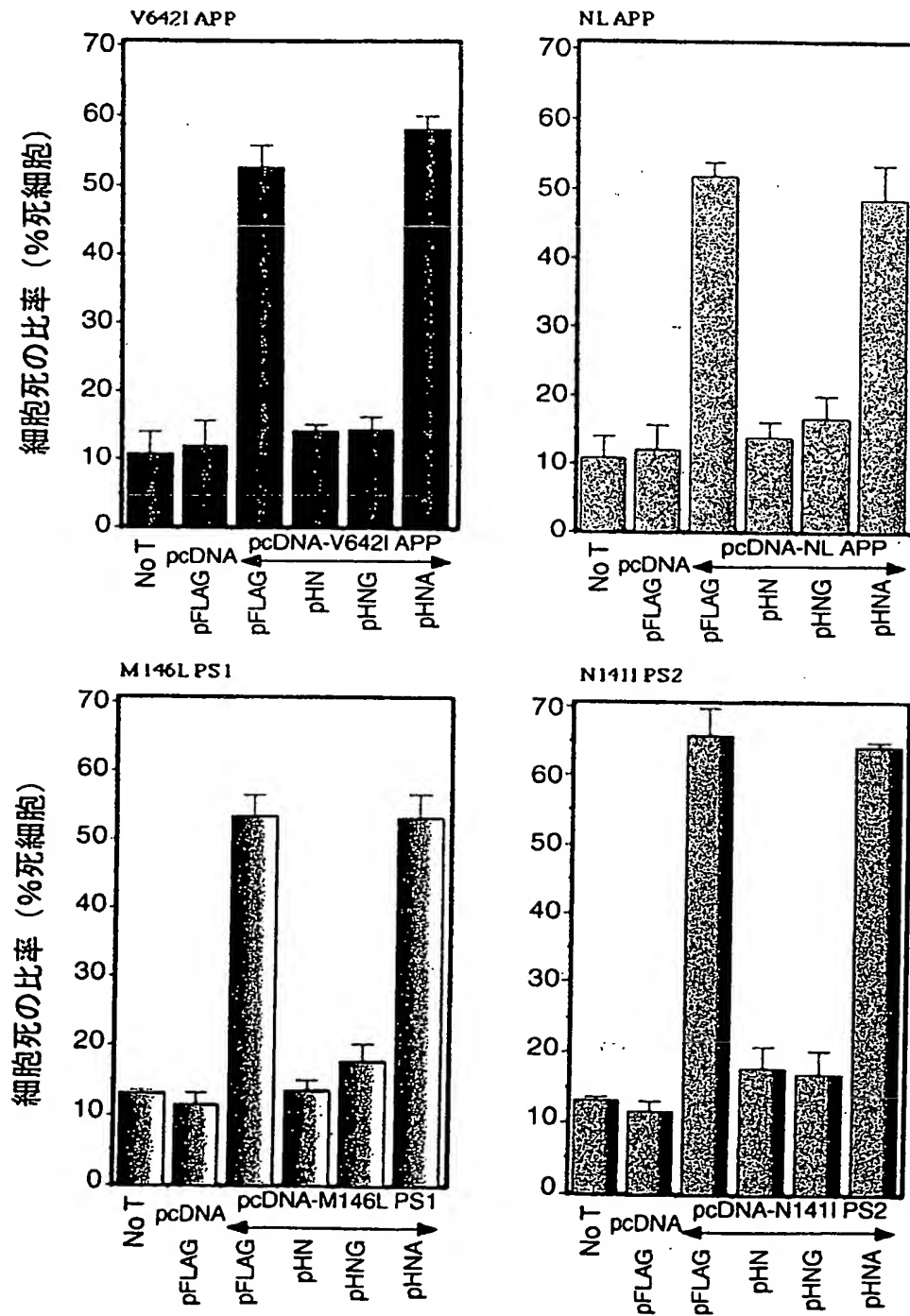
10/25

図 10



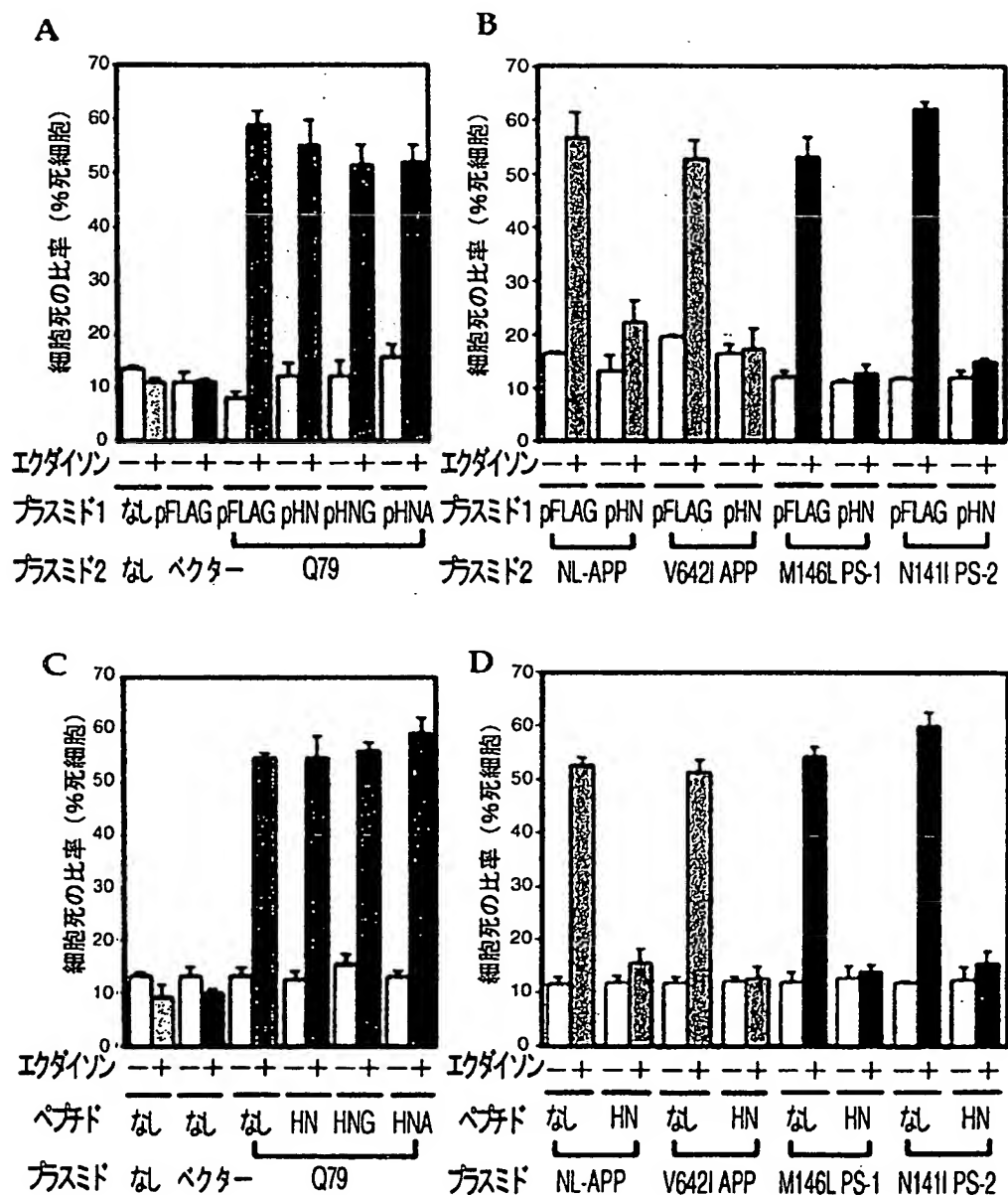
11 / 25

図 11



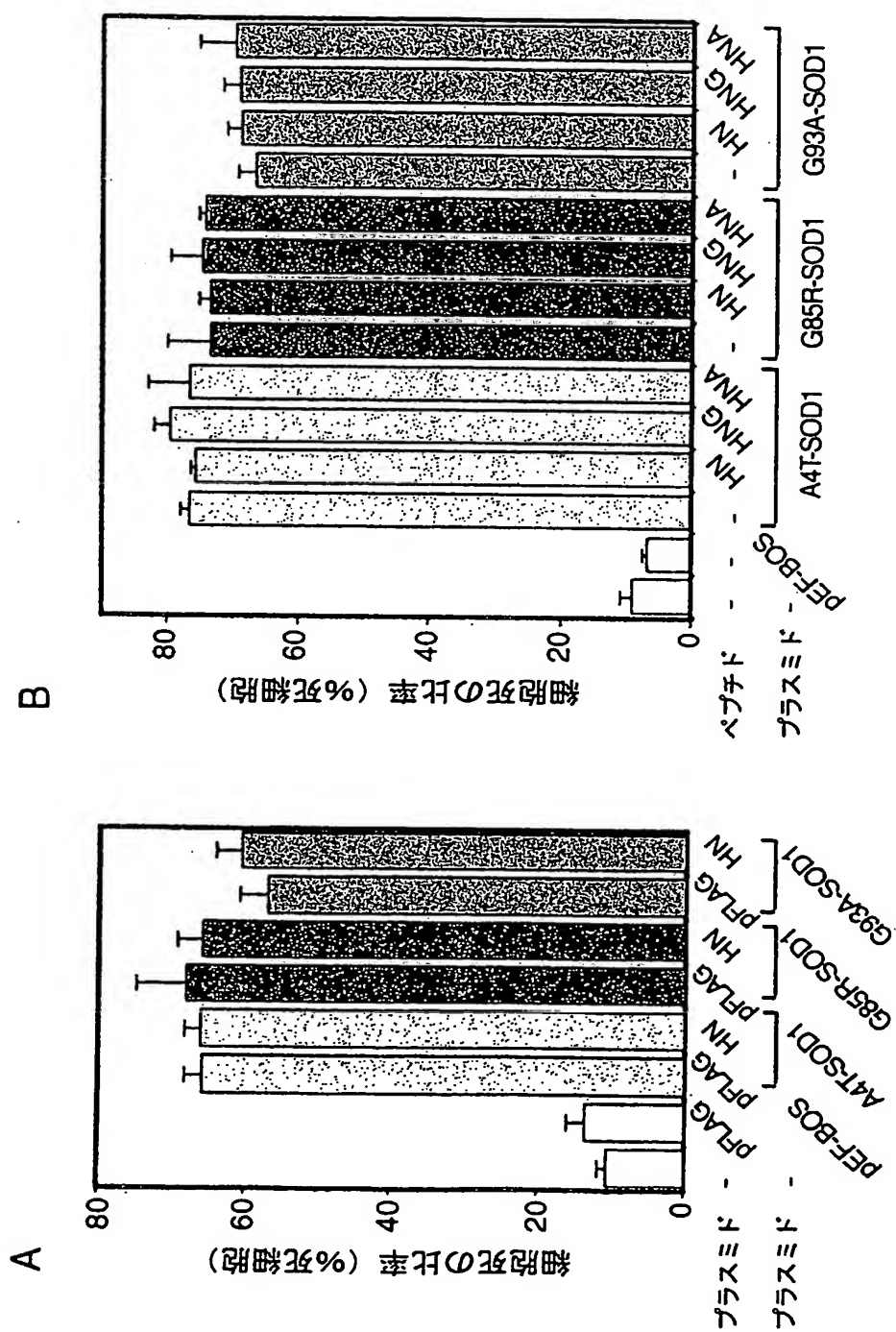
12 / 25

図 12



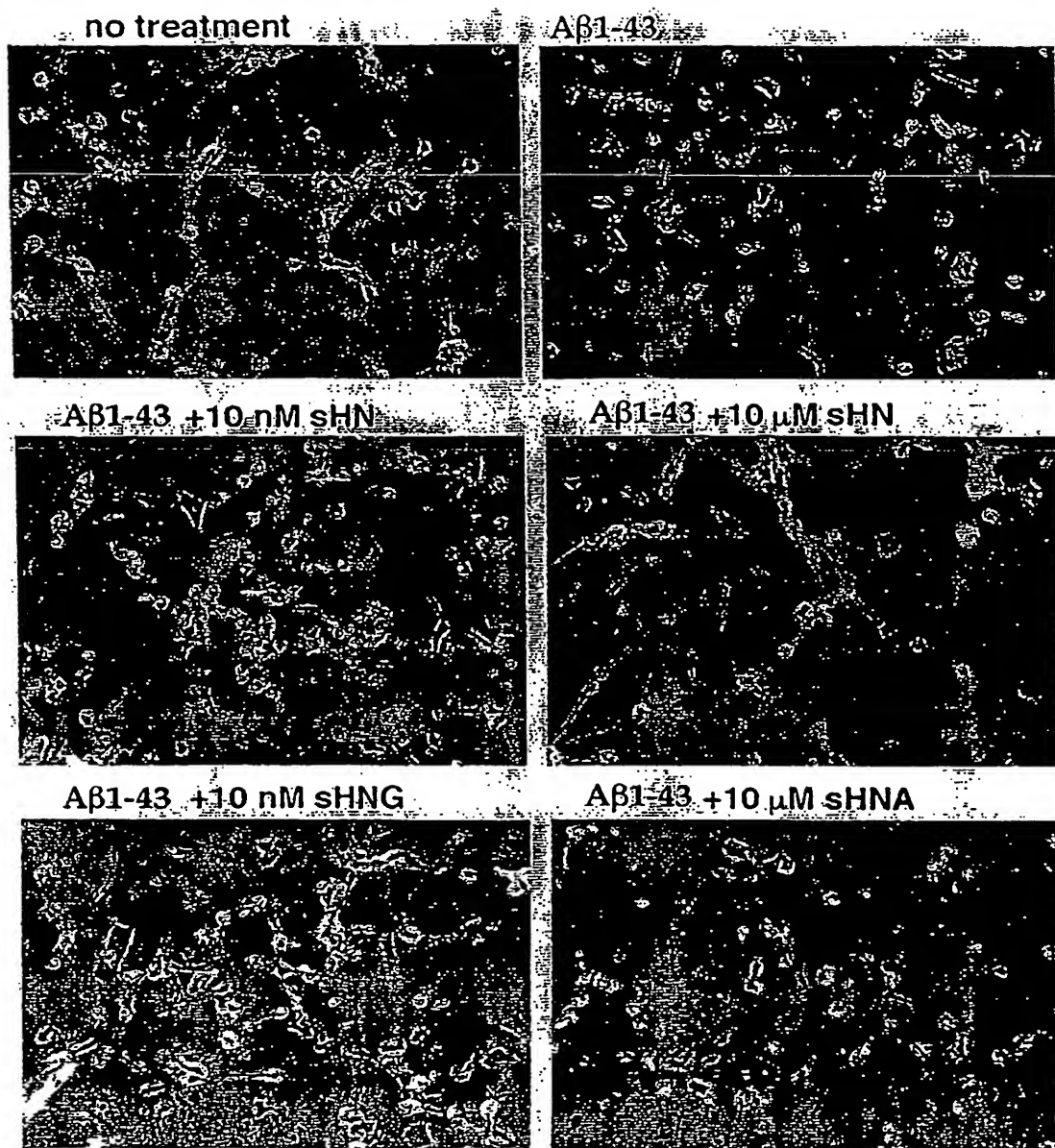
13 / 25

図 13



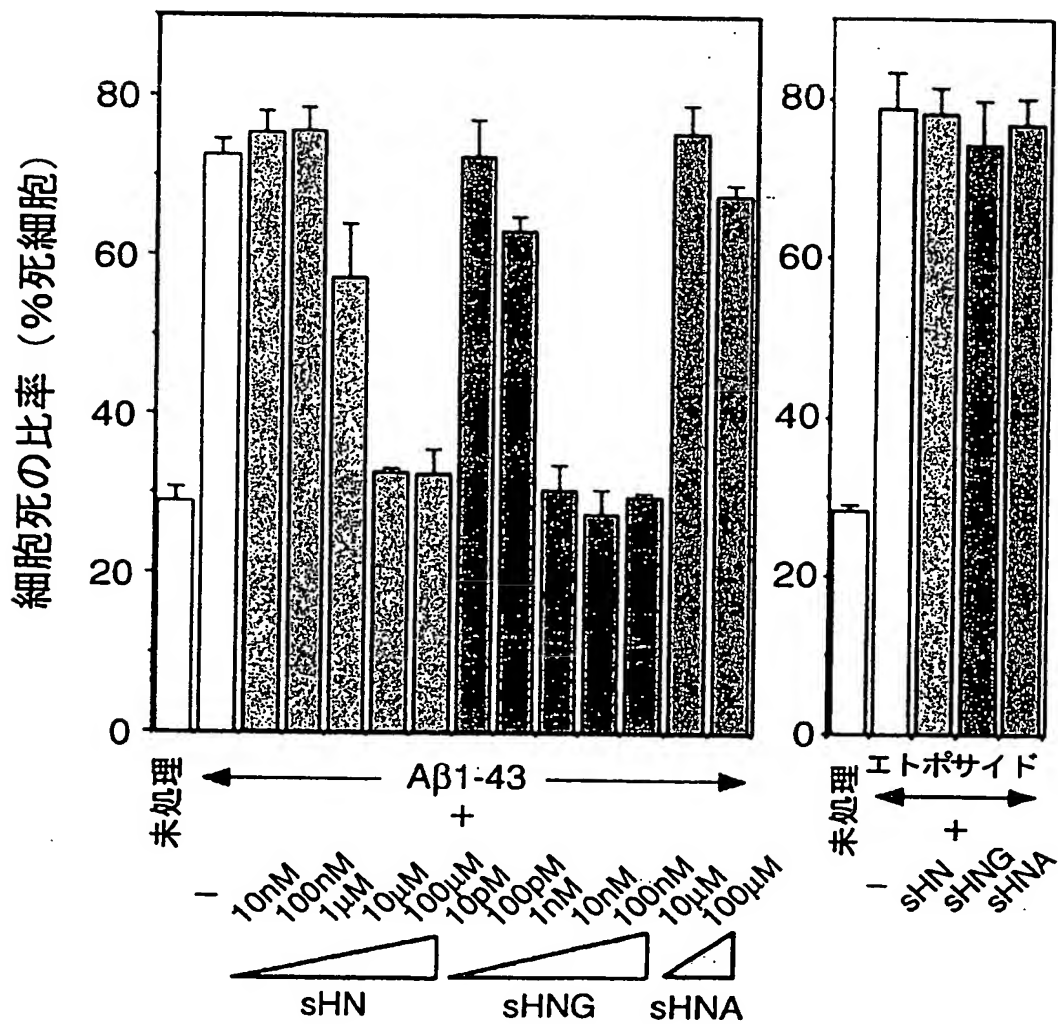
14/25

14



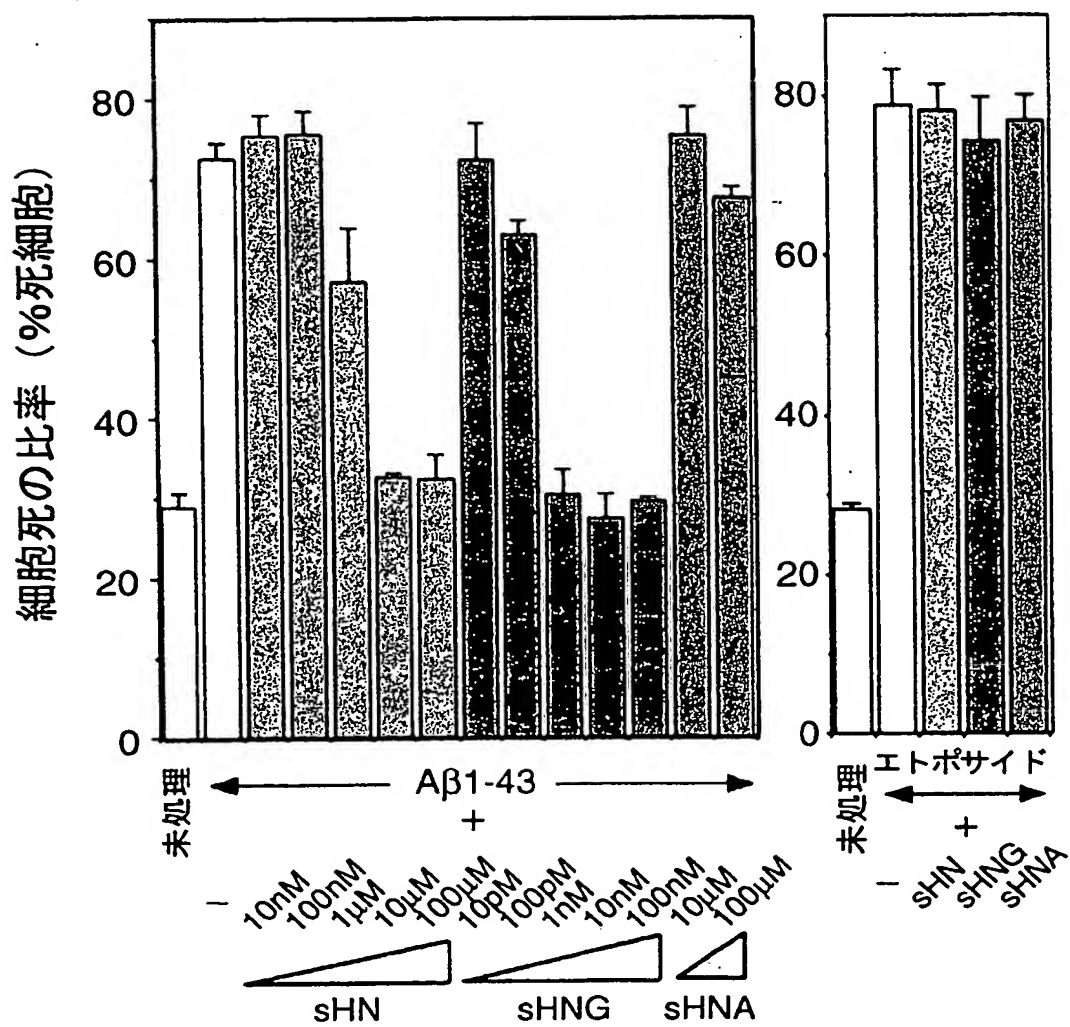
15 / 25

図 15



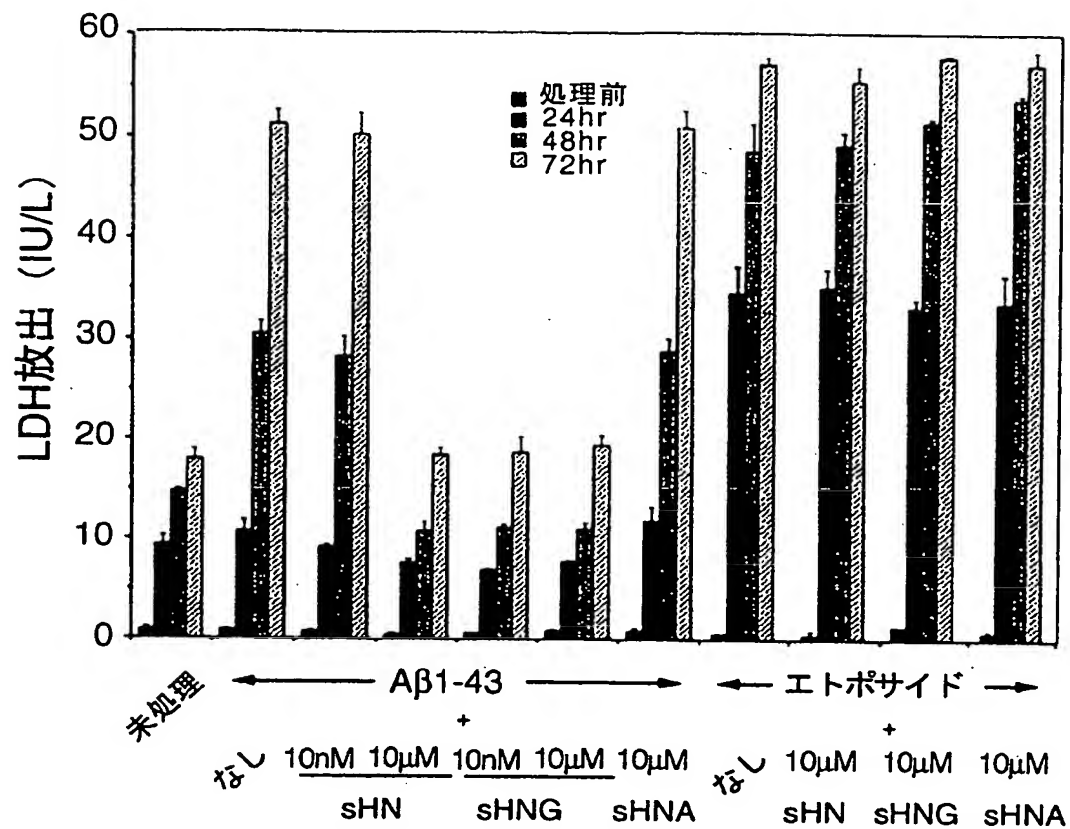
15/25

図15



16/25

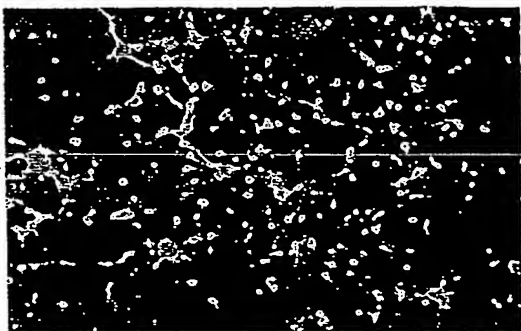
図 16



17/25

17

no treatment



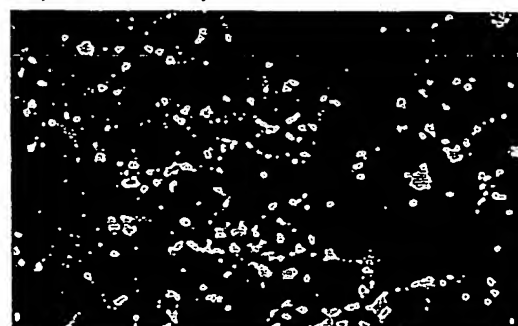
Aβ1-43



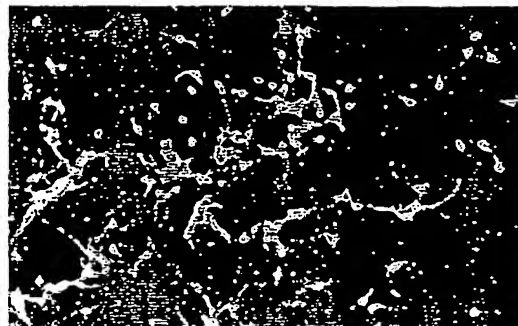
Aβ1-43 +10 nM sHN



Aβ1-43 +10 μM sHN



Aβ1-43 +10 nM sHNG

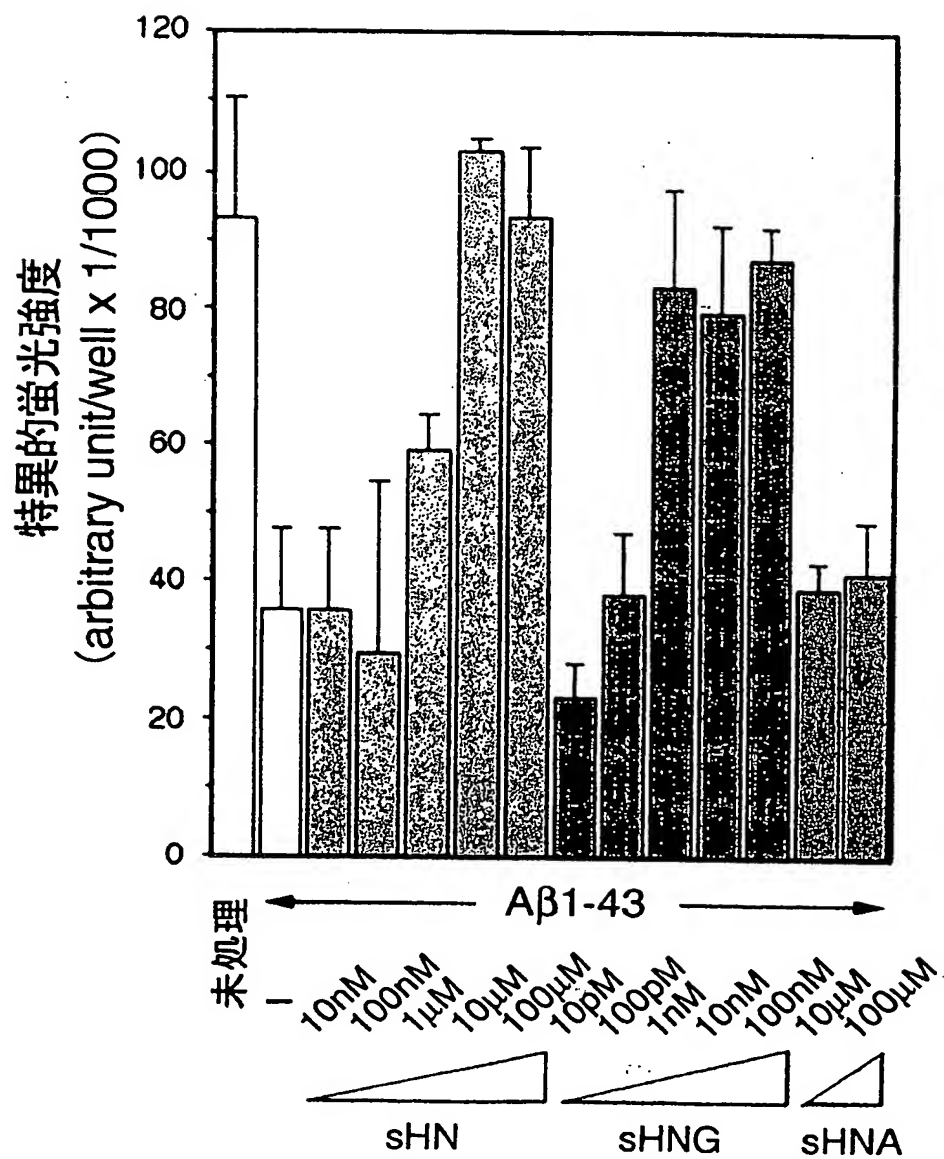


Aβ1-43 +10 μM sHNA



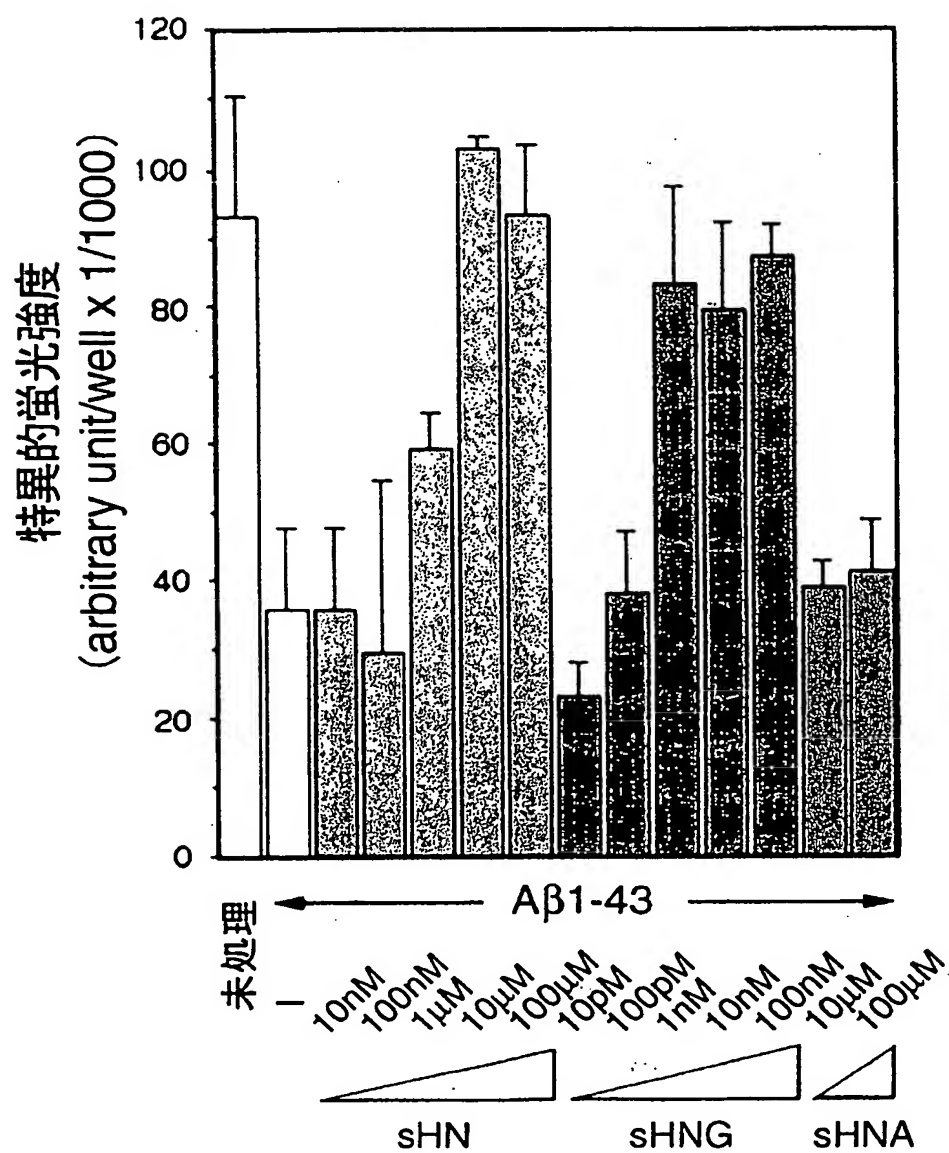
18 / 25

図 18



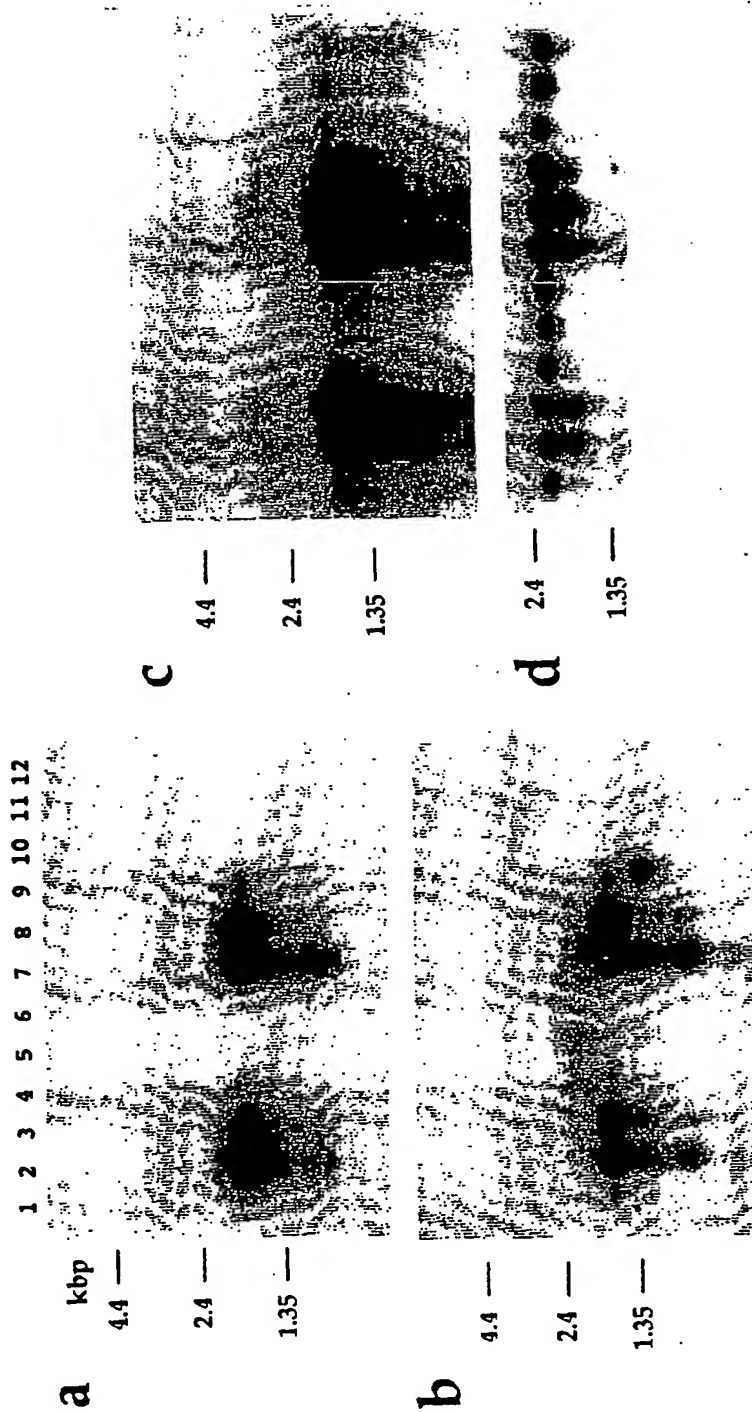
18/25

图 18



19/25

19



20/25

☒ 20

1 2 3 4 5 6

kbp

2.4 —

1.35 —

0.24 —

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

kbp

4.4 —

2.4 —

1.35 —

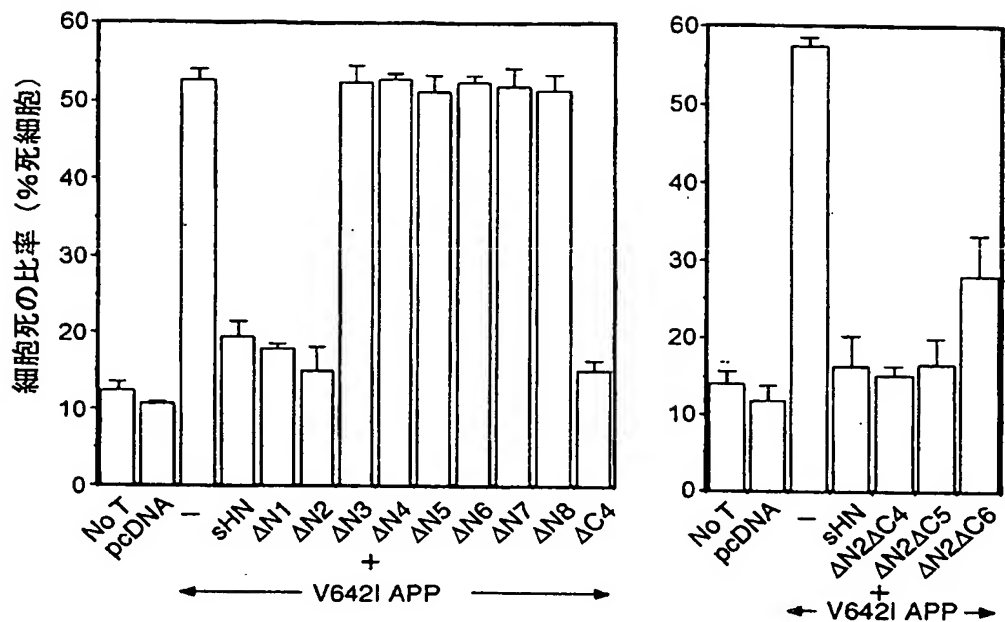
0.24 —

2.4 —

1.35 —

21/25

図 2 1

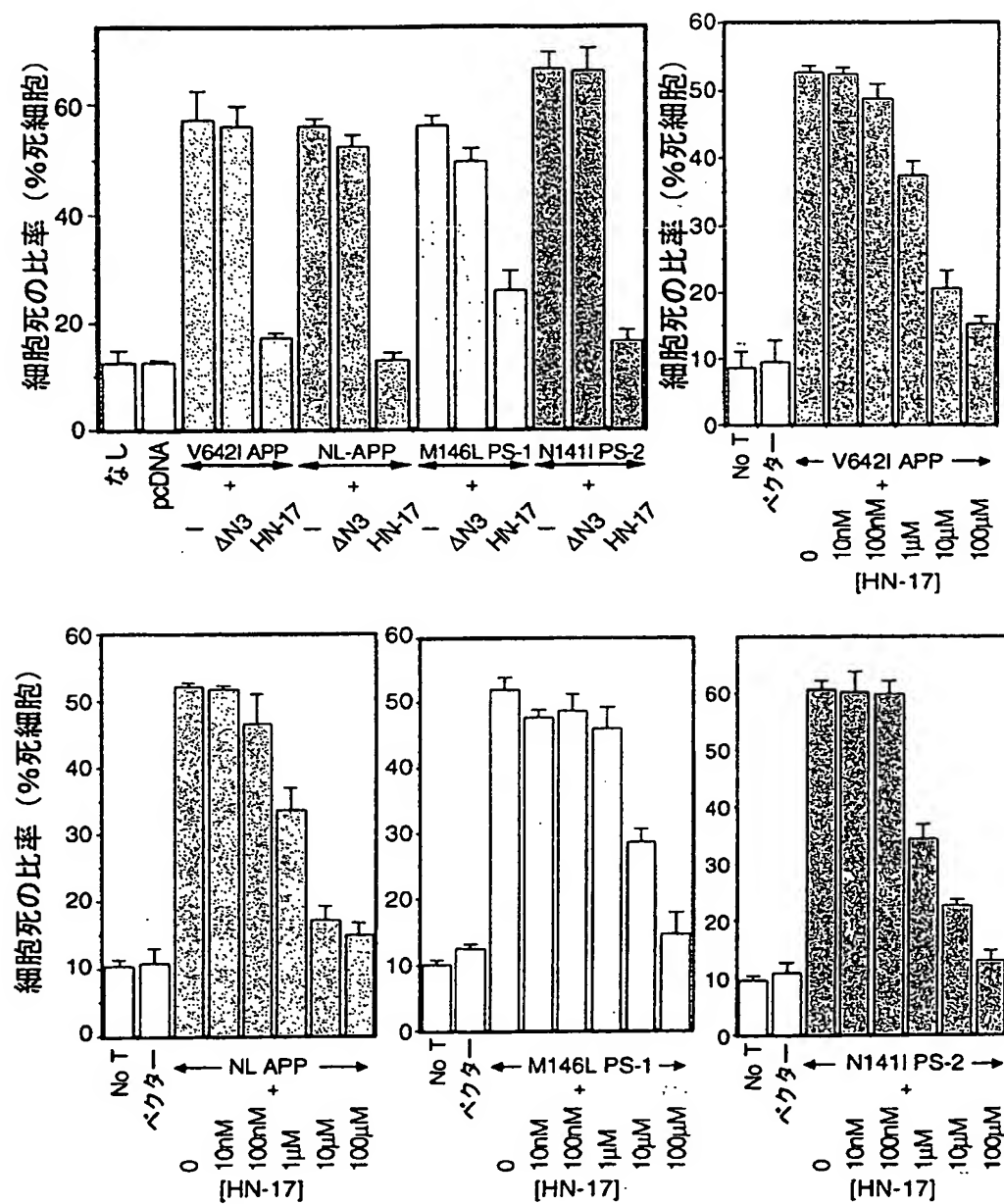


レスキュー活性 配列番号

Humanin:	MAPRGFSCLLLLTSEIDLVPVKRRA	++	5
ΔN ₁ -Humanin:	APRGFSCLLLLTSEIDLVPVKRRA	++	12
ΔN ₂ -Humanin:	PRGFSCLLLLTSEIDLVPVKRRA	++	13
ΔN ₃ -Humanin:	RGFSCLLLLTSEIDLVPVKRRA	-	14
ΔN ₄ -Humanin:	GFSCLLLLTSEIDLVPVKRRA	-	15
ΔN ₅ -Humanin:	FSCLLLLTSEIDLVPVKRRA	-	16
ΔN ₆ -Humanin:	SCLLLLTSEIDLVPVKRRA	-	17
ΔN ₇ -Humanin:	CLLLLTSEIDLVPVKRRA	-	18
ΔN ₈ -Humanin:	LLLLTSEIDLVPVKRRA	-	19
ΔN ₂ ΔC ₆ -Humanin:	PRGFSCLLLLTSEIDL	+	20
ΔN ₂ ΔC ₅ -Humanin:	PRGFSCLLLLTSEIDL	++	21
ΔN ₂ ΔC ₄ -Humanin:	PRGFSCLLLLTSEIDLVP	++	22
ΔN ₂ -Humanin:	PRGFSCLLLLTSEIDLVPVKRRA	++	13
ΔC ₄ -Humanin:	MAPRGFSCLLLLTSEIDLVP	++	23

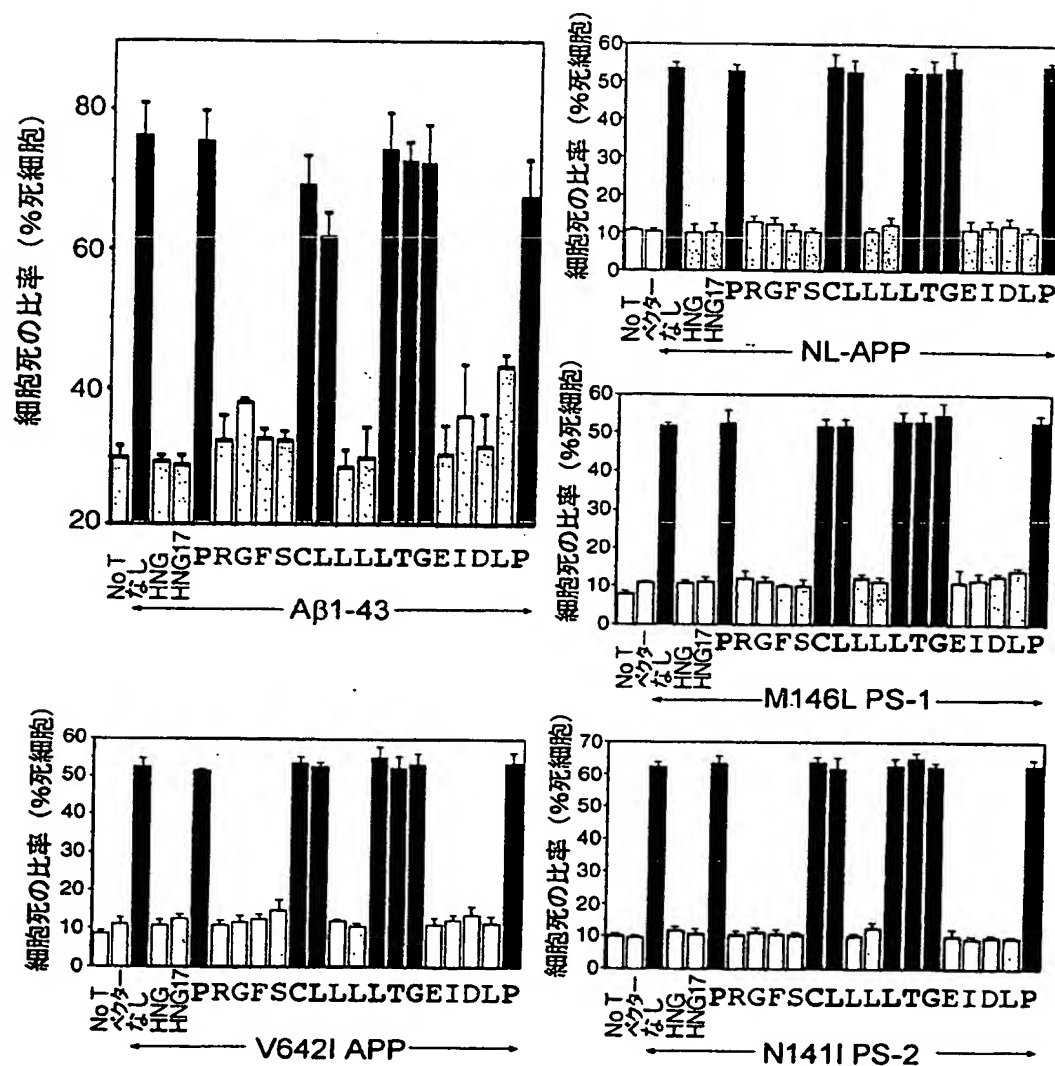
22 / 25

図 22



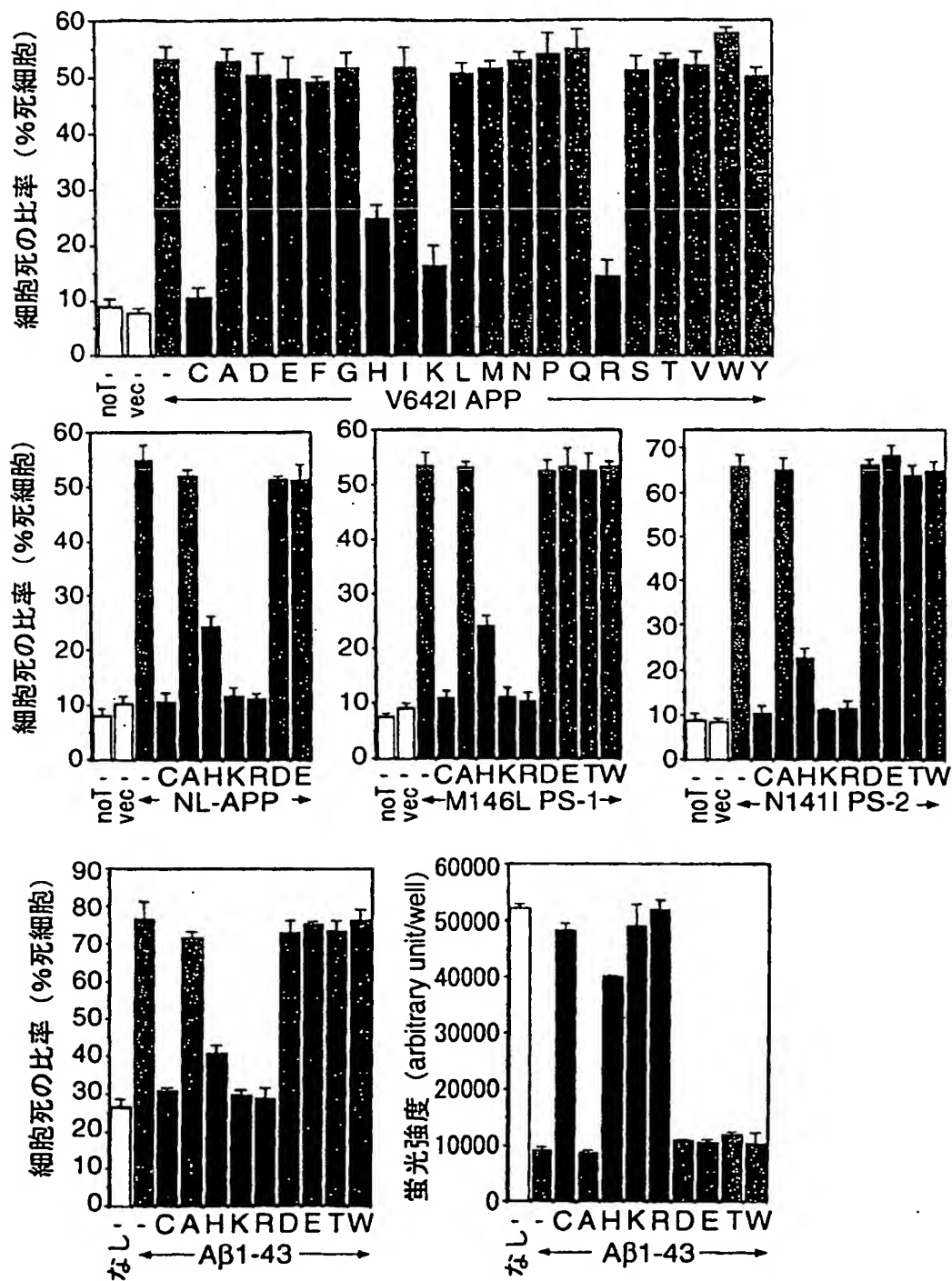
23 / 25

図 23



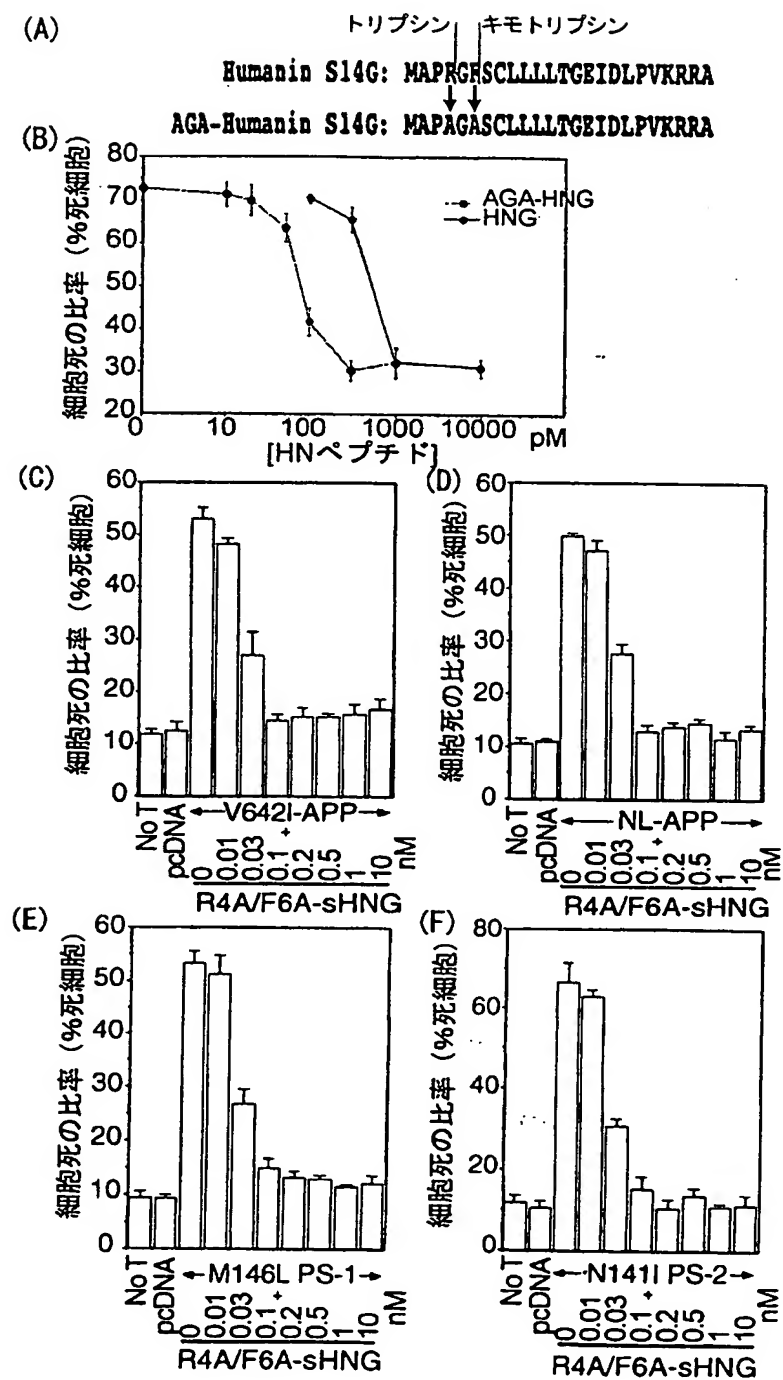
24 / 25

図 24



25 / 25

図 25



SEQUENCE LISTING

<110> Keio University

<120> Humanin, a novel polypeptide that protects neuronal death

<130> KUV-102DP1PCT1

<140>

<141>

<150> JP 1999-264679

<151> 1999-09-17

<150> JP 2000-201456

<151> 2000-06-29

<160> 60

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 85

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 1

aattcacat ggctccacga gggttcagct gtctcttact ttaaccagt gaaattgacc 60
tgcccgtgaa gaggcgggca ggtac 85

<210> 2

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 2

ctgccgcct cttcacgggc aggtcaattt cactgggtaa aagtaagaga cagctgaacc 60
ctcgtggagc catggtg 77

<210> 3

2/21

<211> 79
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: artificially
 synthesized sequence

<400> 3
 ctgccgcct cttcacgggc aggtcaattt cactggtaa aagtaagaga cagctgaacc 60
 ctcgtggagc catgtggtg 79

<210> 4
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(72)

<400> 4
 atg gct cca cga ggg ttc agc tgt ctc tta ctt tta acc agt gaa att 48
 Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile
 1 5 10 15

gac ctg ccc gtg aag agg cgg gca tga 75
 Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala
 20

<210> 5
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile
 1 5 10 15

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala
 20

<210> 6
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

3/21

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence (sHN-FLAG)

<400> 6

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile
1 5 10 15

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala Gly Thr Asp Tyr Lys Asp Asp Asp
20 25 30

Asp Lys

<210> 7

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence (HNR)

<400> 7

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Cys Arg Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile
1 5 10 15

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala
20

<210> 8

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence (HNG)

<400> 8

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile
1 5 10 15

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala
20

<210> 9

<211> 24

<212> PRT

4/21

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence (HNA)

<400> 9

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Ala Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile
1 5 10 15

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala
20

<210> 10

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 10

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile
1 5 10 15

Asp Leu Pro Val Ala Ala Ala Ala
20

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 11

gggtgttgag cttgaacgc

19

<210> 12

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially

5/21

synthesized sequence (deltaN1-Humanin)

<400> 12

Ala Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile Asp
1 5 10 15

Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala
20

<210> 13

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence (deltaN2-Humanin)

<400> 13

Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile Asp Leu
1 5 10 15

Pro Val Lys Arg Arg Ala
20

<210> 14

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence (deltaN3-Humanin)

<400> 14

Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile Asp Leu Pro
1 5 10 15

Val Lys Arg Arg Ala
20

<210> 15

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially

6/21

synthesized sequence (deltaN4-Humanin)

<400> 15

Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile Asp Leu Pro Val
1 5 10 15

Lys Arg Arg Ala
20

<210> 16

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence (deltaN5-Humanin)

<400> 16

Phe Ser Cys Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile Asp Leu Pro Val Lys
1 5 10 15

Arg Arg Ala

<210> 17

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence (deltaN6-Humanin)

<400> 17

Ser Cys Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile Asp Leu Pro Val Lys Arg
1 5 10 15

Arg Ala

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially

7/21

synthesized sequence (deltaN7-Humanin)

<400> 18

Cys Leu Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg
1 5 10 15

Ala

<210> 19

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence (deltaN8-Humanin)

<400> 19

Leu Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala
1 5 10 15

<210> 20

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence (deltaN2 deltaC6-Humanin)

<400> 20

Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile Asp Leu
1 5 10 15

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence (deltaN2 deltaC5-Humanin; HN-17)

<400> 21

Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile Asp Leu
1 5 10 15

8/21

Pro

<210> 22
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence (deltaN2 deltaC4-Humanin)

<400> 22
Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile Asp Leu
1 5 10 15

Pro Val

<210> 23
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence (deltaC4-Humanin)

<400> 23
Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile
1 5 10 15

Asp Leu Pro Val
20

<210> 24
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence (HNG-17)

<400> 24
Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile Asp Leu
1 5 10 15

9/21

Pro

<210> 25

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 25

Ala Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile Asp Leu
1 5 10 15

Pro

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 26

Pro Ala Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile Asp Leu
1 5 10 15

Pro

<210> 27

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 27

Pro Arg Ala Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile Asp Leu
1 5 10 15

10/21

Pro

<210> 28
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 28
Pro Arg Gly Ala Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile Asp Leu
1 5 10 15

Pro

<210> 29
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 29
Pro Arg Gly Phe Ala Cys Leu Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile Asp Leu
1 5 10 15

Pro

<210> 30
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 30
Pro Arg Gly Phe Ser Ala Leu Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile Asp Leu
1 5 10 15

11/21

Pro

<210> 31
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 31
Pro Arg Gly Phe Ser Cys Ala Leu Leu Thr Gly Glu Ile Asp Leu
1 5 10 15

Pro

<210> 32
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 32
Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Ala Leu Thr Gly Glu Ile Asp Leu
1 5 10 15

Pro

<210> 33
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 33
Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Ala Leu Thr Gly Glu Ile Asp Leu
1 5 10 15

12/21

Pro

<210> 34
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 34
Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Ala Thr Gly Glu Ile Asp Leu
1 5 10 15

Pro

<210> 35
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 35
Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Ala Gly Glu Ile Asp Leu
1 5 10 15

Pro

<210> 36
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 36
Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Ala Glu Ile Asp Leu
1 5 10 15

13/21

Pro

<210> 37

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 37

Pro	Arg	Gly	Phe	Ser	Cys	Leu	Leu	Leu	Leu	Thr	Gly	Ala	Ile	Asp	Leu
1				5					10					15	

Pro

<210> 38

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 38

Pro	Arg	Gly	Phe	Ser	Cys	Leu	Leu	Leu	Leu	Thr	Gly	Glu	Ala	Asp	Leu
1				5					10					15	

Pro

<210> 39

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 39

Pro	Arg	Gly	Phe	Ser	Cys	Leu	Leu	Leu	Leu	Thr	Gly	Glu	Ile	Ala	Leu
1				5					10					15	

14/21

Pro

<210> 40
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 40
Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile Asp Ala
1 5 10 15

Pro

<210> 41
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 41
Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile Asp Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 42
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 42
Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Asp Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile
1 5 10 15

15/21

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala
20

<210> 43

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 43

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Glu Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile
1 5 10 15

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala
20

<210> 44

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 44

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Phe Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile
1 5 10 15

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala
20

<210> 45

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 45

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Gly Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile
1 5 10 15

16/21

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala
20

<210> 46
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 46
Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser His Leu Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile
1 5 10 15

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala
20

<210> 47
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 47
Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Ile Leu Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile
1 5 10 15

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala
20

<210> 48
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 48
Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Lys Leu Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile
1 5 10 15

17/21

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala
20

<210> 49

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 49

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Leu Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile
1 5 10 15

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala
20

<210> 50

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 50

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Met Leu Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile
1 5 10 15

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala
20

<210> 51

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 51

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Asn Leu Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile
1 5 10 15

18/21

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala
20

<210> 52

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 52

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Pro Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile
1 5 10 15

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala
20

<210> 53

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 53

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Gln Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile
1 5 10 15

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala
20

<210> 54

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 54

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Arg Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile
1 5 10 15

19/21

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala
20

<210> 55

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 55

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Ser Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile
1 5 10 15

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala
20

<210> 56

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 56

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Thr Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile
1 5 10 15

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala
20

<210> 57

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 57

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Val Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile
1 5 10 15

20/21

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala
20

<210> 58

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 58

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Trp Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile
1 5 10 15

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala
20

<210> 59

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 59

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Tyr Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile
1 5 10 15

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala
20

<210> 60

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence (AGA-HN)

<400> 60

Met Ala Pro Ala Gly Ala Ser Cys Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile
1 5 10 15

WO 01/21787

PCT/JP00/06314

21/21

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala
20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06314

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N15/09, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P21/02,
C07K14/47, 7/08, 16/18, A61K48/00, 38/10, 38/17,
A61P25/28, 25/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N15/00-15/90, C07K7/00-14/825

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PIR/SEISSPROT/GENESEQ
GENBANK/EMBL/DDBJ/GENESEQ
BIOSIS/MEDLINE/WPI (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, March 1998 Qing Guo et al., "Calbindin D28k blocks the proapoptotic actions of mutant presenilin 1: Reduced oxidative stress and preserved mitochondrial function", pp.3227-3232	1-19
A	J Biol Chem, 273(20), May 1998 Qing Guo et al., "Secreted β -amyloid precursor protein counteracts the proapoptotic action of mutant presenilin-1 by activation of NF- κ B and stabilization of calcium homeostasis", pp.12341-12351	1-19
A	neuroreport, 8(17), Dec.1997 Qing Guo et al., "Estrogens stabilize mitochondrial function and protect neural cells against the pro-apoptotic action of mutant presenilin-1", pp.3817-3821	1-19

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
06 December, 2000 (06.12.00)

Date of mailing of the international search report
19 December, 2000 (19.12.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/09, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P21/02,
C07K14/47, 7/08, 16/18, A61K48/00, 38/10, 38/17,
A61P25/28, 25/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/00-15/90, C07K7/00-14/825

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

PIR/SEISSPROT/GENESEQ
GENBANK/EMBL/DDBJ/GENESEQ
BIOSIS/MEDLINE/WPI (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, March 1998 Qing Guo et al., "Calbindin D28k blocks the proapoptotic actions of mutant presenilin 1: Reduced oxidative stress and preserved mitochondrial function", p. 3227-3232	1-19
A	J Biol Chem, 273(20), May 1998 Qing Guo et al., "Secreted β -amyloid precursor protein counteracts the proapoptotic action of mutant presenilin-1 by activation of NF- κ B and stabilization of calcium homeostasis", p. 12341-12351	1-19

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.12.00

国際調査報告の発送日

19.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

4B

9838

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	neuroreport, 8(17), Dec. 1997 Qing Guo et al., "Estrogens stabilize mitochondrial function and protect neural cells against the pro-apoptotic action of mutant presenilin-1", p. 3817-3821	1-19

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.